

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-506135

(P2001-506135A)

(43) 公表日 平成13年5月15日 (2001.5.15)

| (51) Int.Cl. <sup>7</sup>         | 識別記号  | F I            | テマコード (参考) |
|-----------------------------------|-------|----------------|------------|
| C 1 2 N 15/09                     | Z N A | C 1 2 N 15/00  | Z N A A    |
| C 0 7 K 14/705                    |       | C 0 7 K 14/705 |            |
| C 1 2 N 1/15                      |       | C 1 2 N 1/15   |            |
| 1/19                              |       | 1/19           |            |
| 1/21                              |       | 1/21           |            |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 68 頁) 最終頁に続く |       |                |            |

(21) 出願番号 特願平10-528933  
 (86) (22) 出願日 平成9年12月22日 (1997.12.22)  
 (85) 翻訳文提出日 平成11年6月18日 (1999.6.18)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US97/23405  
 (87) 国際公開番号 WO98/28331  
 (87) 国際公開日 平成10年7月2日 (1998.7.2)  
 (31) 優先権主張番号 08/771, 737  
 (32) 優先日 平成8年12月20日 (1996.12.20)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), CA, JP, MX

(71) 出願人 アボット・ラボラトリーズ  
 アメリカ合衆国、イリノイ・60064-3500、  
 アボット・パーク、アボット・パーク・ロ  
 ード・100、チャド・0377/エイ・ビー・  
 6・デュー2  
 (72) 発明者 ブリッグス、クラーク・エイ  
 アメリカ合衆国、イリノイ・60048、リバ  
 テイビル、シャノンデール・2280  
 (72) 発明者 ゴバラクリシナン、ムラリ  
 アメリカ合衆国、イリノイ・60030、グレ  
 イスレイク、オックスフォード・サーク  
 ル・1568  
 (74) 代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変異ヒト $\alpha 7$ アセチルコリン受容体サブユニットならびにその製造法および用途

## (57) 【要約】

野生型ヒト $\alpha 7$ nAChRのパリン274の位置にアミノ酸置換を含有する変異ヒト $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) ポリペプチドを提供する。該変異ヒト $\alpha 7$ nAChRをコードする核酸分子、そのような核酸分子を含有するベクターおよび宿主細胞も提供する。また、該変異体の製造法、およびnAChRにおける活性に関して化合物をスクリーニングするためのそのような変異体の使用方法を提供する。

【特許請求の範囲】

1. 野生型ヒト $\alpha$ 7ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) サブユニットの変異体をコードするポリヌクレオチドであって、野生型ヒト $\alpha$ 7 nAChRサブユニットポリペプチドのバリン274の位置にアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードすることを特徴とするポリヌクレオチド、およびその縮重変異体。
2. 該置換がバリン274からトレオニンへの置換である、請求項1に記載のポリヌクレオチド。
3. 請求項1に記載のポリヌクレオチドを含んでなる宿主細胞。
4. 細菌細胞、哺乳類細胞、酵母細胞、両生類細胞およびヒトデ類細胞よりなる群から選ばれる、請求項3に記載の宿主細胞。
5. 該ポリヌクレオチドが宿主細胞内で発現されるように該ポリヌクレオチドの転写を指令する制御配列に機能しうる形で連結された請求項1に記載のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクター。
6. 該変異ヒト $\alpha$ 7 nAChRがヒト $\alpha$ 5V274T nAChRである、請

求項5に記載の発現ベクター。

7. 請求項5または6に記載の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。
8. 細菌細胞、哺乳類細胞、酵母細胞および両生類細胞よりなる群から選ばれる、請求項7に記載の宿主細胞。
9. 野生型ヒト $\alpha$ 7 nAChRポリペプチドのバリン274の位置にアミノ酸置換を含んでなる、単離および精製された変異ヒト $\alpha$ 7ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) サブユニット。
10. 該置換がバリン274からトレオニンへの置換である、請求項9に記載の変異ヒト $\alpha$ 7受容体。
11. ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) 活性をモジュレーションする化合物を同定するための方法であって、
  - (a) 野生型ヒト $\alpha$ 7 nAChRポリペプチドのバリン274の位置にアミノ酸置換を有する変異ヒト $\alpha$ 7 nAChRポリペプチドを発現する細胞を準備し、
  - (b) 試験化合物と該細胞とを混合し、

(c) (i) 該変異 $\alpha$ 7受容体に対する又は該サブユニットを発現する細胞に対する該試験化合物の効果、または(ii) 該細胞または該受容体に対する該試験化合物の結合のいずれかを測

定することを含んでなる方法。

12. 細胞保護性化合物を同定するための方法であって、

(a) 野生型ヒト $\alpha$ 7サブユニットポリペプチドのバリン274の位置にアミノ酸置換を有する変異ヒト $\alpha$ 7サブユニットポリペプチドまたはその断片を発現する細胞を準備し、

(b) 試験化合物と該細胞とを一緒にし、

(c) 細胞傷害性の指標に関して該細胞または細胞機能をモニターすることを含んでなる方法。

13. 試験サンプル中のヒト変異 $\alpha$ 7サブユニットの標的ポリヌクレオチドを検出する方法であって、

(a) ヒト変異 $\alpha$ 7サブユニットの標的ポリヌクレオチドを少なくとも1つのヒト変異 $\alpha$ 7サブユニット特異的ポリヌクレオチドプローブまたはその相補体と接触させ、

(b) 該試験サンプル中の標的ポリヌクレオチドとプローブとの複合体の存在を検出することを含んでなる方法。

14. ヒト変異 $\alpha$ 7サブユニットの核酸に選択的にハイブリダイズしうる、ヒト変異 $\alpha$ 7サブユニットに由来する精製されたポリヌクレオチドまたはその断片であって、該ポリヌクレオチドの配列が配列番号1またはその一部を含み、該ポリヌクレオ

チドが組換え技術により製造されることを特徴とするポリヌクレオチド。

15. ヒト変異 $\alpha$ 7サブユニットポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドであって、該ポリペプチドの配列が配列番号2またはその一部を含み、該ポリペプチドが組換えまたは合成技術により製造されることを特徴とするポリペプチド。

16. 配列番号 2 またはその一部のアミノ酸配列を含むヒト変異  $\alpha$  7 サブユニットに特異的に結合するモノクローナル抗体。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 変異ヒト $\alpha$ 7アセチルコリン受容体サブユニットならびにその製造法および用途技術分野

本発明は、一般に、受容体タンパク質ならびにそれをコードするDNAおよびRNA分子に関する。特に、本発明は、野生型ヒト $\alpha$ 7サブユニットのバリン274の位置に置換を有する変異ヒト $\alpha$ 7サブユニットに関する。本発明はまた、該変異ヒト $\alpha$ 7サブユニットをコードするDNAおよびRNA分子、ならびに該変異サブユニットと相互作用する化合物を同定するための該変異サブユニットの使用方法に関する。

#### 発明の背景

本発明の背景においては、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) に関する $\alpha$ 7サブユニットを考慮する。nAChRは、アセチルコリン (ACh) および他のリガンドにより開口する陽イオン選択性イオンチャンネルを形成する膜貫通ポリペプチドサブユニットよりなる。各サブユニットからの疎水性膜貫通M2 (「TM-2」) 領域が、そのイオンチャンネルの壁を形成してい

ると考えられる。

より優勢な2つの脳内nAChRは、 $\alpha$ 4サブユニットを含有するもの、および $\alpha$ 7サブユニットを含有するものである (Sargent(1993) Annu. Rev. Neurosci. 16: 403-443; Courtら. (1995) Alzheimer Disease and Associated Disorders 9:6-14)。 $\alpha$ 4および $\alpha$ 7サブユニットの突然変異は、神経系のいくつかの疾患を引き起こす可能性がある。例えば、 $\alpha$ 4サブユニットの突然変異は、いくつかの形態のてんかんに関連している (Beckら (1994) Neurobiol. Disease 1: 95-99; Steinleinら (1995) Nature Genetics 11:201-203)。また、 $\alpha$ 7を含有するnAChRは、精神分裂病に関連した感覚プロセッシング (Freedmanら. (1995) Biol. Psych. 38:22-33; Rollinsら (1995) Schizophr. Res. 15:183; Stevensら (1995) Psychopharmacol. 119:163-170)、細胞保護 (Donnelly-Robertsら (1996) Brain Res 719:36-44; Akaikeら (1994) Brain Res. 644:181-187; Martinら (1994) Drug Dev. Res. 31:135-141; Quirkら (1994) Brain Res. 655:161-167)、および神経

突起の成長および神経支配 (Chanら. (1993) *Neurosci.* 56:441-451;Pughら. (1994) *J.Neurosci.* 14:889-896;Freeman (1977) *Nature* 269:218-222;

Broideら. (1995) *Neurosci.* 67:83-94) に関連している可能性がある。

$\alpha 7$ サブユニットのTM-2領域を含むスプライス変異体がウシクロム親和性細胞内で検出されており (Garcia-Guzmanら (1995) *Eur. J. Neurosci.* 7:647-655)、また、カエノルハブディティス・エレガンス (*Caenorhabditis elegans*) で見出される $\alpha 7$ サブユニットと相同なタンパク質の天然に生じる突然変異は神経変性を招く (Treininら (1995) *Neuron* 14:871-877)。後者は、ニワトリ $\alpha 7$ のバリリン251からトレオニンへの突然変異 (「c- $\alpha 7$ V251T」) に類似したTM-2領域内の単一アミノ酸突然変異であり、 $\alpha 7$  nAChR構造およびサブユニット機能の研究を容易にするためにニワトリ $\alpha 7$ サブユニット内に人工的に導入されるいくつかの突然変異のうちの1つである (Bertrandら (1995) *Sem. Neurosci.* 7:75-90)。

ニワトリ $\alpha 7$ 野生型 (「c- $\alpha 7$ WT」) nAChRと比べて、c- $\alpha 7$ V251T ( $\alpha 7$ -4とも称される) は、高いカルシウム透過性を保有し、遅く脱感受性化し、180倍高いACh感受性を有していた。また、c- $\alpha 7$ V251T nAChRは、通常は $\alpha 7$ および他の野生型nAChRにおけるnAChRアンタゴニストであるジヒドロ- $\beta$ -エリトロジン

(「DH $\beta$ E」) に対して、それがあたかもアゴニストであるかのように応答した (Galziら (1992) *Nature* 359:500-505;Bertrandら (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6971-6975)。これらの研究から、孔を裏打ちするTM-2領域の構造を大まかに示すモデルが導かれ、また、TM-2領域内の特定の突然変異が、正常な受容体活性化状態に加えて受容体脱感作状態で電流を伝導するリガンド依存性イオンチャンネルを生成するという仮説が導かれた (Bertrandら (1995), 前掲; Bertrandら (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1261-1265;Galziら (1995) *Neuropharmacol.* 34:563-582)。

ニワトリ $\alpha 7$  nAChRは啮乳類 $\alpha 7$  nAChRと薬理学的に類似しているが、重大な相違がいくつかある。例えば、1,1-ジメチル-4-フェニルピペラジニウム (「DMP

PJ) は、ニワトリ  $\alpha 7$  nAChRにおいては非常に弱い部分アゴニストであるが、ヒト  $\alpha 7$  nAChRにおいては非常に有効なアゴニストである(Pengら(1994)Mol. Pharmacol. 45:546-554)。これらの相違があるものの、ニワトリ  $\alpha 7$  nAChRにおけるアミノ酸の変化に類似したヒト  $\alpha 7$  nAChRにおけるアミノ酸の変化(特に、決定的に重要なTM-2アミノ酸におけるもの)は、同様の薬理学的および電気生理学的変化を

引き起こすと予想されるであろう。

#### 発明の概要

本発明は、対応するニワトリ受容体変異体に対する類推でバリン274を変化させた変異ヒト  $\alpha 7$  サブユニットに関する。この変異体は、TM-2領域内のアミノ酸置換の相対位置に関してニワトリ  $\alpha 7$  V251T変異体と類似している。しかしながら、該変異ヒト  $\alpha 7$  サブユニットは、予想外に異なる薬理学的および電気生理学的特性を示す。

$\alpha 7$  サブユニットはそれ自体で合体するほか、他のサブユニットとも合体して種々のニコチン性アセチルコリン受容体を形成することが可能である。他のクラスを受容体の成分として同定することができる又はできない更に別のタンパク質との合体の可能性は、必ずしも除外されるわけではない。

したがって、1つの実施形態において、バリン274が置換された変異ヒト  $\alpha 7$  サブユニットをコードするDNA分子を提供する。

もう1つの実施形態においては、そのようなDNA分子を含んでなる組換えベクターを提供する。

もう1つの実施形態において、本発明は、バリン274が置換

されたヒト  $\alpha 7$  サブユニット変異体に関する。

さらにもう1つの実施形態において、本発明は、該DNAにコードされるメッセンジャーRNA、該DNAまたはその断片を含むベクターで形質転換またはトランスフェクトされた組換え宿主細胞、およびそのような細胞を使用する神経変性過程、酵素機能不全、情動障害および免疫機能の治療用の組換えポリペプチドの製造法

に関する。

もう1つの実施形態においては、神経変性過程、酵素機能不全、情動障害および免疫機能などの状態の治療に有用なアンタゴニスト、アンチセンスポリヌクレオチドなどの化合物を提供する。これらの化合物およびアンチセンスポリヌクレオチドを使用して個体を治療する方法も提供する。

さらにもう1つの実施形態においては、該 $\alpha 7$ 変異体を検出するための方法および試薬を提供する。

さらにもう1つの実施形態において、本発明は、該 $\alpha 7$ 変異体を製造するために細胞内で該ヒト $\alpha 7$ サブユニット変異体を発現させる方法に関する。

さらにもう1つの実施形態において、本発明は、該サブユニットまたは該サブユニットを含有する受容体を改変する化合物

の同定方法、およびそのような細胞を使用して細胞保護性化合物を同定する方法に関する。

本明細書の開示を考慮すれば、本発明のこれらの及び他の実施形態は当業者に容易に認識されるであろう。

#### 図面の簡単な説明

図1は、ポリメラーゼ連鎖反応を用いてヒト $\alpha 7V274T$  AChR突然変異DNAを得るための方法を示す。

図2A~2Cは、V274T突然変異を含有するヒト $\alpha 7$  cDNAのヌクレオチド配列（配列番号1）を示す。トレオニン突然変異は太字で示されており、制限部位EcoRVおよびKpn1には下線が付されている。また、該cDNAから導き出したヒト $\alpha 7V274T$ サブユニット変異体の推定アミノ酸配列（配列番号2）も示されている。V274T改変には下線が付されている。

図3では、アフリカツメガエル（*Xenopus*）卵母細胞内で発現されたヒト $\alpha 7V274T$  nAChR（黒塗り記号）およびヒト $\alpha 7$ 野生型nAChR（白抜き記号）におけるACh（菱形）、(-)-ニコチン（丸印）、GTS-21（上向き三角）およびABT-089（下向き三角）に関する濃度-応答関係を図式的に比較している。

図4は、AChによる活性化およびヒト $\alpha 7V274T$ 応答の減衰速



度を、ヒト $\alpha 7$ WT AChRの場合と比較して図示する。

図5は、nAChRアンタゴニストに対するヒト $\alpha 7$ V274Tの応答を図示し、図中、MECはメカミラミン (10M)、MLAはメチルリカコニチン (10nM)、DH $\beta$ Eはジヒドロ- $\beta$ -エリトロイジン(10M)を示す。0-アゴニスト対照は、薬物を含有しない浴溶液(bathing solution)であり、それを20秒間適用した。わずかな0-アゴニスト対照応答が、各ヒト $\alpha 7$ V274T卵母細胞で測定されたため、データをまとめる際にアゴニスト応答から差し引いた。

図6は、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 内で発現したヒト $\alpha 7$ V274Tの、10 $\mu$ M AChに対する応答の電流対電圧の関係を図示しており、図中、丸印は、Ca<sup>2+</sup>依存性二次応答の活性化を妨げるために10mM Ba<sup>2+</sup>を含有する改変Barth溶液(90mM NaCl, 1mM KCl, 0.66mM NaNO<sub>3</sub>, 10mM BaCl<sub>2</sub>, 2.4mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.5mMピルビン酸ナトリウムおよび10mM Na-HEPESバッファー, 最終pH7.55)内で測定された応答を表し(Briggsら (1995) *Neuropharmacol.* 34:583-590を参照されたい)、三角形は、Galziら (1992) *Nature* 359:500-505の条件を追試するためにアトロピンを含有する「OR2」溶液(82.5mM NaCl, 2.5mM KCl, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5Mアトロピン, 5mM Na-HEPESバッファー, 最終

pH7.4)内で測定された応答を表す。

図7は、 $\alpha 7$  nAChR選択的リガンドである[<sup>125</sup>I] $\alpha$ -ブンガロトキシンの、変異ヒト $\alpha 7$ V274TでトランスフェクトされたHEK-293クローンに対する特異的結合を図示する。

#### 発明の詳細な説明

特に示さない限り、本発明の実施においては、当業者の技量の範囲内に含まれる、分子生物学、微生物学、組換えDNA技術、電気生理学および薬理学の通常の技術を用いる。そのような技術は、文献中に十分に説明されている。例えば、Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版(1989); DNA Cloning, Vols. IおよびII (D.N. Glover編1985); Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning*(1984); the series, *Methods In Enzymology* (S. ColowickおよびN. Kaplan編, Academic Press, Inc.); *Transcription a*

nd Translation (Hamesら編1984); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Millerら編 (1987) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (第2版, Springer-Verlag); および PCR: A Practical Approach (McPhersonら編

(1991) IRL Press)を参照されたい。

本明細書において前記または後記で引用されているすべての特許、特許出願および刊行物は、それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする。

本明細書および添付の請求の範囲で用いる名詞は、意味内容から明らかに単数である場合を除き、単数および複数の両方を含む。したがって、例えば、「増幅プライマー」に対する言及は、2以上のそのようなプライマーを含み、「受容体サブユニット」に対する言及は、1個を超えるそのようなサブユニットを含む。

#### A. 定義

本発明の説明においては、以下の用語を使用し、それらは、以下に示すとおりに定義されるものとする。

「AChR」なる語は、神経伝達物質アセチルコリン（「ACh」）の受容体を意味する。AChRは、大まかには、ニコチン性またはムスカリン性として下位区分される。これらの型は、それらの薬理学的性質、構造およびシグナル伝達メカニズムにおいて異なる。

「nAChR」なる語は、ニコチン性アセチルコリン受容体を意味

する。種々のサブユニット構造のnAChRが、筋細胞、ニューロンおよびクロム親和性細胞において最もよく知られているが、それらは必ずしも他の細胞型（例えば、グリア細胞、肥満細胞、血液細胞、繊維芽細胞など）から除外されるわけではない。

「nAChRサブユニット」なる語は、nAChRの形成において、他の該分子と合体しうるタンパク質性分子を意味する。例えば、筋nAChRは、4つの型の膜貫通サブユニットからなる五量体（2つは $\alpha$  1サブユニット、1つは $\beta$  1サブユニット、1つは $\delta$ サブユニット、そして1つはnAChRの形態に応じて $\gamma$ または $\epsilon$ サブユニット

である) であると考えられている。ニューロンnAChRも同様に、五量体であると考えられており、関連しているが異なるサブユニットからなると考えられている。現在のところ、8個のニューロン $\alpha$ サブユニット( $\alpha 2$ - $\alpha 9$ ) および3個のニューロン $\beta$ サブユニット( $\beta 2$ - $\beta 4$ ) が単離されている。いくつかのニューロンnAChRは、機能的な複合体(すなわち、AChまたは他のアゴニストに対するイオンチャンネル応答)のためには少なくとも1個の $\alpha$ サブユニットおよび少なくとも1個の $\beta$ サブユニットを必要とするらしい。しかしながら、アフリカツメガエル(Xenopus) 卵母細胞内およびトランスフェクト化哺乳類細胞

胞内の $\alpha 7$  nAChRの場合と同様に、いくつかのサブユニットは自己集合して「ホモオリゴマー性」 nAChRを形成する可能性がある。nAChRサブユニットと他の型の受容体(例えば、他のクラスのリガンド依存性イオンチャンネル)に関連したサブユニットとの組合せは実証されていないが、本発明の範囲内においてはそのような組合せが可能である。

「野生型」(「WT」と略称される)なる語は、天然に存在する典型的な通常の又は最も一般的な形態を意味する。本発明で用いるヒト野生型 $\alpha 7$  nAChRは、Doucette-Stammら(1993)DrugDev. Res. 30:252-256に記載されている。形態「 $\alpha 7XnnO$ 」の略語は、野生型配列に対してnnn位に位置するアミノ酸Xがアミノ酸Oで置換された $\alpha 7$ サブユニットを意味する。したがって、ニワトリ $\alpha 7V251T$  nAChRは、野生型受容体の251位に位置するバリンがトレオニンで置換されたニワトリ $\alpha 7$  nAChRを意味する。

「ニコチン性コリン作動性アゴニスト」は、ニコチン性アセチルコリン受容体に結合しそれを活性化する化合物である。「活性化」は、1以上の薬理的、生理学的または電気生理学的応答の惹起を意味する。そのような応答には、細胞膜脱分極およ

び $Ca^{2+}$ および他の陽イオン透過性の増加が含まれるが、これらに限定されるものではない。

「ニコチン性コリン作動性アンタゴニスト」は、ニコチン性アセチルコリン受

容体に結合しアゴニストが該受容体を活性化するのを妨げる物質である。純粋なアンタゴニストは該受容体を活性化しないが、いくつかの物質はアゴニストとアンタゴニストとの混合特性を有することがある。ニコチン性コリン作動性チャンネルブロッカーは、ニコチン性アセチルコリン受容体チャンネルを通過する電流をアゴニストが惹起する能力を阻止するが、それを行なうのは、アゴニストが該受容体に結合しそれを活性化するのを妨げることによってではなく、チャンネルを遮断することによる。

「ニコチン性コリン作動性モジュレーター」は、古典的アゴニスト結合部位以外の1以上の部位での相互作用によりニコチン性アセチルコリン受容体の活性に影響を及ぼす物質である。該モジュレーターは、それ自体が受容体活性を増加または減少させることが可能であり、あるいはそれ自体はチャンネル電流の明白な変化を惹起することなく、アゴニスト活性に影響を及ぼす（例えば、応答を増強する）ことが可能である。単一の物

質が、ニコチン性アセチルコリン受容体サブタイプによって異なる特性を有することが可能であり、例えば、1つの受容体においてはアゴニストであり、もう1つの受容体においてはアンタゴニストであったり、あるいは1つの受容体においてはアンタゴニストであり、もう1つの受容体においてはチャンネルブロッカーであることが可能である。

「nAChR調節体」は、アゴニスト、アンタゴニスト、チャンネルブロッカーまたはモジュレーターとして作用しうる物質を意味する。

本発明で用いる「ポリヌクレオチド」なる語は、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドの、任意の長さのヌクレオチドの重合形態を意味する。この用語は、該分子の一次構造のみをさす。したがって、該用語は、二本鎖および一本鎖のDNAならびに二本鎖および一本鎖のRNAを含む。また、それは、該ポリヌクレオチドのメチル化体またはキャップ形成体などの修飾体、および非修飾形態を含む。

「変異（体）」なる語は、1以上のヌクレオチドにおいて関連野生型配列とは異なるオリゴヌクレオチド配列を表すために使用する。そのような変異オリゴヌ

クレオチドは、タンパク質

変異体（これは、本発明で用いる場合には、1以上のアミノ酸の置換、挿入または欠失において野生型ポリペプチドとは異なるポリペプチド配列を示す）として発現される。変異ポリペプチドは、一次構造（アミノ酸配列）においては野生型と異なるが、二次もしくは三次構造または機能においては野生型と有意に異なる又は異なることが可能である。

「突然変異体」なる語は、一般には、遺伝子または染色体の変化の結果として新たな遺伝的特性または表現型を示す生物または細胞を意味する。しかしながら、場合によっては、「突然変異（体）」は、変異タンパク質またはオリゴヌクレオチドに関して用いることが可能であり、「突然変異」は、該変異本を与える変化を意味することがある。

「ポリペプチド」および「タンパク質」は、本発明では互換的に用い、ペプチド結合で結合したアミノ酸の分子鎖を示す。これらの用語は、特定の長さの該産物を意味するものではない。したがって、ポリペプチドの定義には、ペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質が含まれる。これらの用語は、該ポリペプチドの翻訳後修飾、例えばグリコシル化、アセチル化、リン酸化などを含む。また、タンパク質断片、類似体、突然変異ま

たは変異タンパク質、融合タンパク質などが、ポリペプチドの意義に含まれる。

本発明で用いる「機能的に保存された突然変異」は、誘導体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの変化であって、該誘導体の出発ポリペプチドの活性と比べて活性を実質的に変化させない変化を意味する。そのような誘導体は、例えば、その特性に実質的に影響を及ぼさない、関連分子内のアミノ酸の挿入、欠失または置換を有することが可能である。例えば、該誘導体には、同類アミノ酸置換、例えば、置換されるアミノ酸の全体の電荷、疎水性／親水性、側鎖部分および／または立体的の高さ（stearic bulk）を維持する置換、例えば、Gly/Ala、Val/Ile/Leu、Asp/Glu、Lys/Arg、Asn/Gln、Thr/SerおよびPhe/Trp/Tyrを含めることが可能である。

「構造的に保存された突然変異体」なる語は、核酸配列の変化を含有するが該縮重変異体が由来するポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。これは、特定のアミノ酸が該ポリヌクレオチド内の2以上の「コドン」（すなわち3ヌクレオチドの配列）にコードされることが可能なこ

とにより生じうる。

「組換え宿主細胞」、「宿主細胞」、「細胞」、「細胞系」、「細胞培養」および単細胞体として培養された微生物または高等真核細胞系を示す他のそのような用語は、組換えベクターまたは他の導入DNAのレシピエントとして使用される又は使用されている細胞を意味し、該DNAを該細胞内に導入する方法またはそれにより生じる該細胞の性質には無関係である。これらの用語は、トランスフェクトされた元の細胞の後代を含む。初代培養内の細胞、および卵母細胞などの細胞も、レシピエントとして使用することができる。

「ベクター」は、別のポリヌクレオチドセグメントが結合して例えば該結合セグメントの複製および／または発現を引き起こすレプリコンである。この用語は、発現ベクター、クローニングベクターなどを含む。

「コード配列」は、mRNAに転写され及び／又はポリペプチドに翻訳されるポリヌクレオチド配列である。該コード配列の境界は、5'末端の翻訳開始コドンと、3'末端の翻訳停止コドンとにより定められる。コード配列には、mRNA、cDNAおよび組換えポリヌクレオチド配列を含めることが可能であるが、これらに

限定されるものではない。変異体または類似体は、コード配列の一部の欠失、配列の挿入および／または該配列内の1以上のヌクレオチドの置換により調製することができる。ヌクレオチド配列を修飾するための技術（例えば、部位特異的突然変異誘発）は、当業者によく知られている。例えば、Sambrookら、前掲；DNA Cloning, Vols. IおよびII, 前掲；Nucleic Acid Hybridization, 前掲を参照されたい。

「機能しうる形で連結（された）」は、記載されている成分が、それらの意図

される状態で機能しうる関係で存在している状況を意味する。したがって、例えば、コード配列に「機能しうる形で連結」している制御配列は、該制御配列に適合しうる条件下で該コード配列の発現が達成されるように連結されている。コード配列は、ポリヌクレオチドの転写を指令して該ポリヌクレオチドを宿主細胞内で発現させる制御配列に、機能しうる形で連結させることができる。

「トランスフェクション」なる語は、宿主細胞内に外因性ポリヌクレオチドを挿入することを意味し、その導入に用いる方法や、挿入するポリヌクレオチドの分子形態には無関係である。ポリヌクレオチド自体の挿入および外因性ポリヌクレオチドか

らなるプラスミドまたはベクターの挿入が含まれる。外因性ポリヌクレオチドは、該細胞により直接的に転写され翻訳されたり、非組込みレプリコン（例えば、プラスミド）として維持されることが可能であり、あるいは宿主ゲノム内に組込まれることが可能である。「トランスフェクション」は、一般には、真核細胞に関して使用し、一方、「形質転換」なる語は、原核細胞内へのポリヌクレオチドの挿入を表すために使用する。また、真核細胞の「形質転換（トランスフォーメーション）」は、癌または腫瘍状態の形成をも意味する。

ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに関して言及する場合の「単離（された）」なる語は、分子が、類似した他の生物学的巨大分子の実質的に不存在下で存在することを意味する。本発明で用いる「単離（された）」なる語は、組成物の少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも85重量%、一層好ましくは少なくとも95重量%、最も好ましくは少なくとも98重量%が、単離されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドであることを意味する。ある特定のポリペプチドをコードする「単離（された）」ポリヌクレオチドは、該ポリペプチドをコードしない他の核酸分子を実質的に含まないポリヌクレオチドを意

味するが、該分子には、本明細書中に定義する機能的および／または構造的に保存された突然変異を含めることが可能である。

本明細書全体においては、以下の1文字アミノ酸略語を使用する。

|        |   |          |   |
|--------|---|----------|---|
| アラニン   | A | アルギニンR   |   |
| アスパラギン | N | アスパラギン酸  | D |
| システイン  | C | グルタミン    | Q |
| グルタミン酸 | E | グリシン     | G |
| ヒスチジン  | H | イソロイシン   | I |
| ロイシン   | L | リシン      | K |
| メチオニン  | M | フェニルアラニン | F |
| プロリン   | P | セリン      | S |
| トレオニン  | T | トリプトファン  | W |
| チロシン   | Y | バリン      | V |

#### B. 一般的方法

変異ヒト $\alpha$ 7サブユニット、該変異サブユニットをコードするポリヌクレオチド、および変異サブユニットの製造法を、本発明で提供する。本発明は、変異サブユニットだけでなく、該変異サブユニット、該変異サブユニットを発現する細胞を使用

して化合物をスクリーニングする方法も含む。

1つの好ましい実施形態では、該ポリヌクレオチドは、野生型 $\alpha$ 7サブユニットのバリン274が置換されたヒト $\alpha$ 7サブユニット変異体をコードする。好ましくは、該ポリヌクレオチドは、バリン274がトレオニン（または例えばトレオニンの代わりにセリンを用いる同類置換）で置換されたヒト $\alpha$ 7サブユニットをコードする。

ヒト $\alpha$ 7変異nAChRは、構造的に関連した他のnAChRに対して類似した特性および予想外に異なる特性の両方を示す。例えば、ニワトリ $\alpha$ 7V251T変異体の場合と同様に、ヒト $\alpha$ 7V274Tは、ヒト野生型 $\alpha$ 7nAChR応答と比べて、コリン作動性アゴニストの減衰に対して遅く応答する。また、ヒト $\alpha$ 7V274Tは、野生型と比べて約2桁高いコリン作動性受容体アゴニスト（例えば、ニコチンおよびACh）感受性を有する。

ヒト $\alpha$ 7V274Tは、ジヒドロ- $\beta$ -エリトロイジン（DH $\beta$ E）により、弱く活性化



され、一方、ニワトリ $\alpha 7V251T$ は強力に活性化される点で、ヒトおよびニワトリ受容体変異体は薬理学的に異なる(図5およびGalziら, (1992))。ニューロンニコチン性受容体のチャンネルドメイン内の突然変異は、イオン選択性

を陽イオン性から陰イオン性へ変換する(Nature 359:500-505)。また、d-ツボクラリンは、関連するニワトリ $\alpha 7L247T$ 突然変異体の活性化物質と比べると、ヒト $\alpha 7V274T$ の強力なアゴニストである(Bertrandら (1992) Unconventional pharmacology of a neuronal nicotinic receptor mutated in the channel domain . Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:1261-1265)。ヒト $\alpha 7$ 受容体変異体およびニワトリ $\alpha 7$ 受容体変異体は、電気生理学的にも異なっている。例えば、強い内向き整流性を示すニワトリおよびヒトの両方の $\alpha 7$ 野生型nAChR (Galziら (1992), 前掲およびBriggsら (1995) Neuropharmacol. 34:583-590)とは異なり、ニワトリ $\alpha 7V251T$  nAChRは内向き整流性を示さない(Galziら, (1992))。ヒト $\alpha 7V274T$  nAChRは、ニワトリ $\alpha 7V251T$  nAChRとは異なり、野生型受容体と同様に0mV以上で整流する(図6)。

ヒト変異体 $\alpha 7$  nAChRサブユニットをコードするDNAは、ゲノムまたはcDNA(合成により、またはいくつかの技術の組合せにより調製されたもの)に由来するものであることが可能である。ついで、当技術分野でよく知られている方法を用いて、ヒト変異体 $\alpha 7$  nAChRサブユニットを発現させるために、あるい

はRNAの調製のための鋳型として、該DNAを使用することができる(Sambrookら, 前掲)。

所望のDNAを得るための1つの方法は、Doucette-Stammら(1993), 前掲に記載のとおり、野生型ヒト $\alpha 7$  nAChRサブユニットをコードするcDNAを単離することを含む。ついで、このようにして得た野生型cDNAを、ポリメラーゼ連鎖反応(「PCR」)および突然変異プライマー配列を用いて修飾し増幅して、ヒト変異体 $\alpha 7$  nAChRサブユニットをコードするDNAを得る。より詳しくは、PCRでは、野生型DNA分子内の所望の配列の反対末端とマッチする短いオリゴヌクレオチドプライマー(一般には、10~20ヌクレオチド長)を使用する。該プライマー間の配列は、既

知でなくてもよい。最初の鋳型は、RNAまたはDNAのいずれかであることが可能である。RNAを使用する場合には、まず、それをcDNAに逆転写させる。ついで加熱などの良く知られている技術を用いて該cDNAを変性させ、適当なオリゴヌクレオチドプライマーをモル過剰で加える。

突然変異を保持するプライマーは、野生型プライマー—ポリヌクレオチド二重らせんの温度より若干低い温度で、該野生型ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることになる。プライマ

ーの長さ及び塩基組成を比較的狭い範囲内に維持することにより、また、突然変異塩基を中央の位置に維持することにより、プライマーを特異的なものとすることができる (Zollerら (1983) Meth. Enzymol. 100:468)。プライマー伸長は、デオキシヌクレオチド三リン酸またはヌクレオチド類似体の存在下でDNAポリメラーゼを使用して行なう。得られた産物は、元の鎖の新たに合成された相補体に共有結合したそれぞれのプライマーを、それらの5'末端に含む。該産物が十分に増幅されるまで、複製された分子を再び、変性、プライマーに対するハイブリダイゼーションなどに付す。そのようなPCR法は、例えば、米国特許第4,965,188号、第4,800,159号、第4,683,202号、第4,683,195号（それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする）に記載されている。該PCRの産物をクローニングし、プライマー伸長鎖の分離により誘導された突然変異DNAを含有するクローンを選択する。該突然変異プライマーをハイブリダイゼーションプローブとして使用して、選択を行なうことができる。

別法として、適当なDNAライブラリーから野生型DNAを得ることができる。DNAライブラリーは、Grunsteinら(1975)Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 73:3961に記載の方法によりプローブすることができる。

もう1つの別法として、ヒトRNAから出発するRT-PCR（逆転写ポリメラーゼ連鎖反応）アプローチにより、 $\alpha$ 7V274T変異体を得ることが可能であろう。例えば、標準的な逆転写法により、鋳型としてのヒトRNA（約1.5g）から一本鎖cDNAを合成する。ついで該cDNAを2つのセグメントにおいて増幅し、PCRおよび2対の

プライマーを用いて突然変異を導入する。内部プライマーは、野生型の274位バリン (V) の代わりにトレオニン (T) のコドンまたは他の所望の変化を保持するように設計する (後記実施例 1 および図 1 も参照されたい)。α 7V274T の完全長コード配列を再増幅するために、3 および 5 末端プライマーを使用して、それらの 2 つの PCR 反応の産物を一緒にする。これは、ヒト脳鋳型から α 7V274T を得る唯一の例である。

合成オリゴヌクレオチドは、例えば Warner (1984) DNA3:401 に記載の自動オリゴヌクレオチド合成装置を用いて調製することができる。所望により、該合成鎖を <sup>32</sup>P で標識することが可能であり、これは、該反応のための標準的な条件を用いて <sup>32</sup>P-ATP の存在下にポリヌクレオチドキナーゼで処理することにより行

なうことができる。DNA 配列 (ゲノムまたは cDNA ライブラリーから単離したものを含む) は、Zoller (1982) Nucleic Acids Res. 10:6487 に記載の部位特異的突然変異誘発などの公知方法により修飾することができる。簡単に説明すると、修飾する DNA を、一本鎖配列としてファージ内にパッケージングし、修飾する DNA 部分と相補的で所望の修飾をそれ自体の配列内に有する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして使用して、DNA ポリメラーゼで二本鎖 DNA に変換する。該ファージの各鎖の複製体を含有する形質転換細菌の培養物を寒天内にプレーティングする。理論的には、新たなプラークの 50% が、突然変異配列を有するファージを含有し、残りの 50% は元の配列を有する。未修飾配列にはハイブリダイズせずに正しい鎖にハイブリダイズするのに適した温度および条件で、プラークの複製体を標識合成プローブにハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションにより同定された配列を回収し、クローニングする。あるいは、小さな相違の変異体を野生型からハイブリダイゼーションにより識別するのが困難な場合には、配列分析によりクローンを同定することが必要かもしれない。いずれの場合も、該 DNA を配列から確認することになる。

ついで、該 DNA が得られたら、それをクローニングベクターまたは発現ベクター内に取込ませて、適当な宿主細胞内で複製する。ベクターの構築には、当技術

分野で公知の方法を用いる。一般には、商業的に入手可能な制限酵素の製造業者が一般に指定している条件下、適当な制限酵素で処理することにより、部位特異的DNA切断を行なう。制限酵素と共にインキュベートした後、抽出によりタンパク質を除去し、沈殿により該DNAを回収する。切断されたその断片は、例えば、当業者に公知の方法に従いポリアクリルアミドまたはアガロースゲル電気泳動法を用いて分離することができる。

大腸菌 (*E. coli*) DNAポリメラーゼ1 (クレノウ) を、該混合物中に存在する適当なデオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP) の存在下で使用して、付着末端の切断断片を平滑末端化することができる。また、S1ヌクレアーゼでの処理により、いずれかの一本鎖DNA部分を加水分解することも可能である。

連結反応は、T4 DNAリガーゼおよびATPを使用して標準的なバッファーおよび温度条件を用いて行なう。あるいは、連結反応を妨げるために、望ましくない断片の制限酵素消化を用いることができる。

標準的なベクター構築物は、一般には、特異的抗生物質耐性要素を含む。連結反応混合物を適当な宿主中に形質転換し、望みどおりに得られた形質転換体を抗生物質耐性または他のマーカーにより選択する。ついで該形質転換体からのプラスミドを、通常は、Clewellら (1972) *J. Bacteriol.* 110:667において報告されている以下のクロラムフェニコール増幅による当業者に公知の方法に従い調製することができる。該DNAを単離し、通常は制限酵素分析および/または配列決定により分析する。配列決定は、よく知られているSangerら (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463のジデオキシ法 (さらにMessingら (1981) *Nucleic Acid Res.* 9:309に記載されている) により、またはMaxamら (1980) *Meth. Enzymol.* 65:499に報告されている方法により行なうことができる。GCに富む領域で時々認められるバンド圧縮 (band compression) の問題は、例えば、Barrら (1986) *Biotechniques* 4:428において報告されている方法に従いT-デアゾグアノシンまたはイノシンを使用することにより克服される。

クローニングベクターまたは発現ベクターであることが可能な本発明のベクターで、宿主細胞を遺伝的に操作する。該ベク

ターは、プラスミド、ウイルス粒子、ファージなどの形態であることが可能である。プロモーターを活性化するために、あるいは形質転換体／トランスフェクト体を選択するために、あるいは該サブユニットをコードするポリヌクレオチドを増幅するために適宜修飾された通常の栄養培地内で、その操作された宿主細胞を培養することができる。温度、pHなどの培養条件は、一般には、発現用に選択された宿主細胞で既に用いられているものと同様であり、当業者には明らかであろう。

所望のコード配列の発現のためには、原核性および真核性の両方の宿主細胞を使用することが可能であり、適宜、示されている宿主に和合性の制御配列を用いる。例えば、原核性宿主のなかでは、大腸菌 (*Escherichia coli*) が頻繁に使用される。また、例えば、原核生物用の発現制御配列には、オペレーター部分を所望により含有するプロモーター、およびリボソーム結合部位が含まれるが、これらに限定されるものではない。原核性宿主に和合性の導入用ベクターは、例えば、アンピシリンおよびテトラサイクリン耐性を付与するオペロンを含有するプラスミド pBR322、および抗生物質耐性マーカーを付与する配列を同様に含有する種々の pUCベクターから誘導することができる。

これらのマーカーを使用して、望みどおり生成した形質転換体を選択により得ることができる。一般に使用される原核性制御配列には、ラクトースオペロン系 (Changら (1977) *Nature* 198:1056)、トリプトファンオペロン系 (Goeddelら (1980) *Nucleic Acid Res* 8:4057において報告されている)、および  $\lambda$  由来 P1 プロモーターおよび N 遺伝子リボソーム結合部位 (Shimatakeら (1981) *Nature* 292:128)、ならびに trp および lac UV5 プロモーターの配列に由来するハイブリッド Tac プロモーター (DeBoerら (1983) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 292:128) が含まれるが、これらに限定されるものではない。前記の系は、特に大腸菌に和合性であるが、所望により、バシラス (*Bacillus*) 株またはシュードモナス (*Pseudomonas*) 株などの他の原核性宿主を使用することが可能である。

真核性宿主には、酵母および哺乳類細胞 (培養系内のもの) が含まれる。ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、

ces cerevisiae) およびエス・カールスベルゲンシス (*S. carlsbergensis*) が、一般に使用される酵母宿主である。酵母に和合性のベクターは、栄養要求突然変異体に対する原栄養性または重金属に対する耐性を野

生型株に付与することにより望みどおりの形質転換体の選択を可能にするマーカーを保持する。酵母和合性ベクターは、2- $\mu$ 複製起点 (Broachら (1983) *Meth. Enzymol.* 101:307)、CEN3とARS1との組合せ、または複製を確実にするための他の手段、例えば、宿主細胞ゲノム内への適当な断片の取込みを引き起こす配列を用いることが可能である。酵母ベクター用の制御配列は、当技術分野で公知であり、解糖酵素の合成のためのプロモーター、例えば3-ホスホグリセリン酸キナーゼ用のプロモーターなどが含まれるが、これらに限定されるものではない。例えば、Hessら (1968) *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149、Hollandら (1978) *Biochemistry* 17:4900およびHitzeman (1980) *J. Biol. Chem.* 255:2073を参照されたい。例えば、いくつかの有用な制御系としては、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) プロモーターまたはアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) 調節可能プロモーター、同様にGAPDHに由来するターミネーター、および分泌が望ましい場合には酵母 $\alpha$ 因子由来のリーダー配列を含む制御系が挙げられる。また、機能しうる形で連結された転写調節領域および転写開始領域は、野生型生物内で天然に結合していない形態であることが可能である。

発現用の宿主として利用可能な哺乳類細胞系は、当技術分野で公知であり、American Type Culture Collectionなどの寄託機関から入手可能である。これらには、HeLa細胞、ヒト胎児腎 (HEK) 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、乳児ハムスター腎 (BHK) 細胞などが含まれるが、それらに限定されるものではない。また、哺乳類細胞に適したプロモーターは、当技術分野で公知であり、例えばシミアンウイルス40 (SV40)、ラウス肉腫ウイルス (RSV)、アデノウイルス (ADV)、ウシパピローマウイルス (BPV)、サイトメガロウイルス (CMV) に由来するウイルスプロモーターなどが挙げられる。また、哺乳類細胞はターミネーター配列およびポリA付加配列を必要とする可能性があり、発現を増強す

るエンバンサー配列を含むことが可能であり、該遺伝子の増幅を引き起こす配列も望ましいかもしれない。これらの配列は当技術分野で公知である。哺乳類細胞内での複製に適したベクターは、ウイルスレプリコンを含むことが可能であり、あるいは変異体 $\alpha 7$  nAChRサブユニットをコードする適当な配列の、宿主ゲノム内への組込みを保証する配列を含むことが可能である。nAChR用の哺乳類発現系の一例は、Gopalakrishnanら (1995) Stable expression and

pharmacological properties of the human  $\alpha 7$  nicotinicacetylcholine receptor. Eur. J. Pharmacol. -Mol. Pharmacol. 290:237-246に記載されている。

他の真核系も公知であり、両生類細胞 (Briggsら (1995) Neuropharmacol. 34:583-590に記載の方法を用いる)、昆虫細胞 (SummersおよびSmith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555(1987)に記載の方法を用いる) などの系内へポリヌクレオチドを導入するための方法が公知である。

バキュロウイルス発現系を用いて、高レベルの組換えタンパク質を昆虫宿主細胞内で得ることが可能である。この系は、哺乳類細胞と同様に該タンパク質を翻訳後プロセッシングしながら、高レベルのタンパク質を発現するのを可能にする。これらの発現系は、バキュロウイルスの感染後に活性化されて昆虫細胞内でのクローン化遺伝子の発現を駆動するウイルスプロモーターを用いる (O'Reillyら (1992), Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, IRL/Oxford University Press)。

トランスフェクションは、ポリヌクレオチドをウイルス内に

パッケージングしたり、宿主細胞によるポリヌクレオチドの直接取込みによりウイルスを宿主細胞に導入するなどの、ポリヌクレオチドを宿主細胞内に導入するための公知の任意の方法であることが可能であり、これらの方法は当業者に公知である。選択するトランスフェクション法は、トランスフェクトする宿主に左右され、通常の実施者により決定される。

変異受容体サブユニットの発現は、該受容体に選択的な放射性リガンドを使用

して検出することができる。例えば、ニコチン性コリン作動性受容体の場合には、そのようなリガンドは、 $[^{125}\text{I}]\alpha$ -ブングアロトキシンであることが可能である。しかしながら、当技術分野で公知の任意の放射性リガンド結合技術を用いて、該受容体サブユニットを検出することができる（例えば、Winzorら（1995）*Quantitative Characterization of Ligand Binding*, Wiley-Liss, Inc., NYを参照されたい）。

硫安またはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、レクチンクロマトグラフィーなどの公知方法により、変異nAChRポリペプチドを、それを発現する組換え宿主細胞培養から回収し、精製する。必

要に応じて、該タンパク質の立体配置を完全なものにするために、タンパク質のリフォールディング工程を行なうことが可能である。最後に、最終的な精製工程として、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いることができる。

また、本発明のヒト $\alpha 7$ 変異ポリペプチドまたはその断片は、当技術分野で公知の通常の技術により、例えば固相ペプチド合成などの化学合成により合成することができる。一般に、これらの方法では、固相または液相合成法を用いる。例えば、固相ペプチド合成技術に関しては、J. M. StewartおよびJ. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 第2版, Pierce Chemical Co., Rockford, IL(1984)ならびにG. BaranyおよびR. B. Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, E. GrossおよびJ. Meienhofer編, Vol. 2, Academic Press, New York, (1980), pp. 3-254を、古典的な液相合成に関しては、M. Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Berlin (1984)ならびにE. GrossおよびJ. Meienhofer編, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, 前掲, Vol. 1を参照されたい。

1つの好ましい系においては、所望の変異ヒト $\alpha 7$ nAChRサブ

ユニットを共にコードするDNAまたはそれに由来するRNAを、アフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）卵母細胞などの細胞内への直接注入により発現させることが



できる。この方法を用いて、該DNAまたは該mRNAにコードされるヒト $\alpha 7$  nAChRサブユニット変異体の機能を以下のとおりに評価することができる (Dascal (1987) CRC Crit. Rev. Biochem. 22:317-387を参照されたい)。変異本をコードするポリヌクレオチドを卵母細胞内に注入して、機能的受容体サブユニットに翻訳させる。発現された変異ヒト $\alpha 7$  nAChRの機能は、細胞内電圧記録 (intracellular voltage recording)、2電極電圧固定法、パッチクランプ法などの種々の電気生理学的技術により該卵母細胞内で評価することができる。nAChRに固有の陽イオン伝導性チャンネルは、AChまたは他のニコチン性コリン作動性アゴニストに応答して開口し、膜貫通電流の流動を可能にする。この電流は、電圧固定技術により直接的に、あるいは細胞内電圧記録により間接的にモニターすることができ、この場合、誘導電流による膜電位の変化が測定される。

nAChR活性をモジュレーションする化合物を同定するために、組換え宿主細胞内で発現される受容体を使用することができる。

この点に関して、該受容体に対する親和性を示す化合物の結合の特異性は、該受容体を発現する細胞またはこれらの細胞からの膜に対する該化合物の親和性を測定することにより示される。これは、該細胞、細胞膜または単離された受容体に対する標識 (例えば放射能標識) された化合物の特異的結合を測定することにより、あるいは該化合物が基準標識リガンドの特異的結合を置換する能力を測定することにより行なうことができる。変異受容体の発現と、これらの細胞または膜に対する標識リガンドの結合する化合物または該結合を阻害する化合物に関するスクリーニングとにより、該受容体に対する高い親和性を有する化合物の迅速な選択のための方法が提供される。これらの化合物は、該受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニストであることが可能である。

また、ニコチン性アセチルコリン受容体活性をモジュレーションする化合物 (すなわち、ニコチン性コリン作動性アゴニストまたはアンタゴニスト) に関してスクリーニングするために、発現された受容体を使用することができる。nAChR活性をモジュレーションするための化合物を同定するための1つの方法は、野生型ヒト $\alpha 7$  nAChRポリペプチドのバリン274の位置にアミ

ノ酸置換を有する変異ヒト $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) ポリペプチドを発現する細胞を準備し、試験化合物と該細胞とを一緒にし、該変異受容体活性に対する該試験化合物の効果を測定することを含む。該細胞は、細菌細胞、哺乳類細胞、酵母細胞、両生類細胞、または該受容体を発現する他の任意の細胞であることが可能である。好ましくは、該細胞は、哺乳類細胞または両生類細胞である。したがって、例えば、試験化合物は、それが適当な応答（例えば、膜貫通電流流動の刺激）を惹起する能力、またはそれがコリン作動性アゴニストに対する応答を阻害する能力に関して評価する。

さらに、細胞保護効果を示す化合物をスクリーニングするために、発現された受容体を使用することができる。膜チャンネルの異常な活性化は、神経変性疾患の潜在的原因である。この点に関して、ヒトの多数の遺伝的障害は、ニューロン変性を伴う (Adamsら (1989) *Degenerative Disease of the Nervous System, Principles of Neurology*, McGraw-Hill, NY, pp.921-967)。これらの疾患の原因を研究するために、多数のモデル系が使用されている。例えば、アミロライド感受性ナトリウムイオンチャンネルに関与するタンパク質に対して著しい

配列類似性を有するタンパク質内の突然変異が、線虫シーエレガンス (*C. elegans*) における空胞性神経変性に関連している (Canessaら (1993) *Nature*, 361:467-470; Callessaら (1994) *Nature*, 367:463-467; Linguegliaら (1993) *FEBS Lett* 318:95-99; および Voilleyら (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:247-251)。deg-3タンパク質中のいわゆる「ゲイン・オブ・ファンクション (gain-of-function)」突然変異は、小さな1組のニューロンの空胞性変性を引き起こす (Treininら (1995), 前掲)。この突然変異の研究はこれらの検討に対して、ニューロンアセチルコリン受容体内の突然変異が特異的ニューロン集団の死を招く可能性があるとし唆している。

また、感覚ゲーティング (sensory gating)、免疫機能の改変および神経障害性疼痛（例えば、癌状態、ヘルペス後神経痛、糖尿病性神経障害およびオセオ関節炎 (osteoarthritis) に関連した疼痛) などの障害の治療に有用な化合物をスクリーニングするために、該 $\alpha 7$ 変異体を使用することができる。さらに、癌細

胞を治療したり又は殺すために、該 $\alpha 7$ 変異体を使用することが可能であろう。

したがって、ニコチン性薬物は、アルツハイマー病、ダウン

症候群、クールー病、パーキンソン病、多系統萎縮症、神経障害性疼痛などを含む（これらに限定されるものではない）いくつかの神経変性障害の潜在的な治療剤と考えられ、そのような場合、該薬物は細胞死を遅らすのに有用であろう。野生型 $\alpha 7$  nAChRの活性化は、細胞保護特性（例えば、細胞溶解の減少、Donnelly-Robertsら（1996）*In bitro neuroprotective properties of the novel cholinergic Channel activator (ChCA)*, ABT-418. *Brain Res.* 719:36-44を参照されたい）を惹起するらしい。しかしながら、完全アゴニスト又は部分アゴニストのいずれが好ましいのか、また、後者の場合に、どの型の部分アゴニスト（例えば、開口または脱感受性状態を安定化するもの、または該受容体の開口および静止状態を安定化するもの）が最良であるかは、未だ最終的には確認されていない。これらの問題を評価するために、また、リガンドの中から特異的な型の部分アゴニストまたは特異的な型のアンタゴニストを選択するために、この変異 $\alpha 7$  nAChRを使用することができる。それは、開口状態においてのみ伝導する野生型受容体とは異なり、この変異 $\alpha 7$  nAChRが脱感受性状態および開口状態において電流を伝導するからである（BertrandおよびChangeux（1995）

Nicotinic receptor: An allosteric protein specialized for intercellular communication. *Sem Neurosci.* 7:75-90)。したがって、ヒト変異nAChRサブユニットにより、アゴニストの効力は、脱感受性状態に対するアゴニストの親和性と一致したレベルにまで2桁変化する。さらに、野生型 $\alpha 7$  nAChRサブユニットにおいて脱感受性状態および開口状態を安定化しうるため部分アゴニストであるリガンドは、変異体nAChRサブユニットにおいては、それが脱感受性状態で伝導しうるため、増加した効力を有すると予想されるであろう。そのような効力および効能の変化の例を、ヒト $\alpha 7V274T$  nAChRに関して図3に示す。

したがって、 $\alpha 7$  nAChRリガンドの薬理的性質は、ヒト変異nAChRサブユニットの使用による新規方法で定義することができる。物質は、非伝導性の脱感受性

状態を安定化するそれらの能力のため、あるいは静止状態を安定化したりイオンチャンネルを遮断するなどの他のメカニズムのため、野生型  $\alpha 7$  nAChRにおいてアンタゴニストであることが可能であろう。同様のメカニズムが、野生型  $\alpha 7$  nAChRにおける部分アゴニズムに寄与している可能性がある。リガンドが脱感受性状態を安定化する能力は、変異  $\alpha 7$  nAChR（例えば、ヒト  $\alpha 7V274T$ ）における該

リガンドの効力および効能を野生型  $\alpha 7$  nAChRにおけるその効力および効能と比較することにより評価することが可能であろう。化合物とnAChRとの相互作用は、膜貫通電流流動または電位の電気生理学的測定、電位感受性色素またはイオン感受性色素の蛍光の測定、または放射性イオン流動（例えば、 $^{22}\text{Na}^+$ または $^{86}\text{Rb}^+$ ）の測定を含む（これらに限定されるものではない）いくつかの方法、および種々の  $\alpha 7$  nAChR発現系（例えば、培養内のトランスフェクト化哺乳類細胞または注入された両生類細胞）を用いて同定することができる。 $\alpha 7$  nAChRの薬理学的性質のこの新規定義は、細胞または動物の機能に対する  $\alpha 7$  リガンドの効果の測定と共に、新規治療剤の開発に決定的に重要となるかもしれない。例えば、 $\alpha 7$  nAChRサブユニットの脱感受性状態を安定化するリガンド（部分アゴニストまたはアンタゴニスト）が細胞保護に好ましいか否かを判定することが可能であろう。同様に、認識、記憶、不安、注意、感覚ゲーティング（精神病および精神分裂病）などの他のニコチン適用に多少なりとも有用なリガンドの型を、変異  $\alpha 7$  nAChRサブユニットを単独で又は他の受容体サブユニットと組合せて使用して評価することが可能であろう。

試験化合物のスクリーニングに加えて、細胞傷害および細胞保護のメカニズムを研究するために、発現した変異  $\alpha 7$  サブユニットを使用することができる。 $\alpha 7$  nAChRサブユニットの活性化が細胞保護的であるという証拠は、 $\alpha 7$  nAChRサブユニットを発現する細胞内でnAChRアゴニストが細胞保護を惹起し、この細胞保護が選択的  $\alpha 7$  アンタゴニストにより阻害されるという知見から得られる（例えば、Donnelly-Robertsら、前掲を参照されたい）。そのメカニズムは不明だが、

$\text{Ca}^{2+}$ 流入の刺激を含んでいる可能性がある。もしそうであれば、持続的な電流の活性化による $\text{Ca}^{2+}$ 透過性の維持による変異 $\alpha 7$  nAChRにより媒介される $\text{Ca}^{2+}$ 流入の増加が、細胞保護を増強する可能性がある。一方、過剰な細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ は細胞傷害性であることが知られているため、変異 $\alpha 7$  nAChRの過剰な発現または刺激は、 $\alpha 7$ 変異体に類似したdeg3内の内因性突然変異を保持するシーエレガンス (*C. elegans*) で観察されるのとおそらく同様の細胞死を引き起こしうるであろう。あるいはまた、 $\alpha 7$  nAChRサブユニットは、受容体の状態の変化（例えば、静止コンホメーションから脱感受性コンホメーションへの変化）に依存したメカニズムにより機能することが可能であり、これは、それと他のタンパ

ク質との相互作用に影響を及ぼすが、イオン流動または電位の変化には必ずしも左右されない可能性がある。変異 $\alpha 7$  nAChRサブユニットは、そのようなメカニズムの決定において決定的に重要であろう。なぜなら、それは、異なる受容体状態を促進するリガンドを同定することを可能にし、また、それは、nAChRのコンホメーションやリガンドの結合とは無関係にnAChRチャンネル電流を操作するための手段を提供するからである。

変異nAChRと相互作用する細胞保護性または細胞傷害性化合物は、いくつかの方法を用いて同定することができる。1つのそのような方法は、野生型ヒト $\alpha 7$  nAChRポリペプチドのバリン274の位置にアミノ酸置換を有する変異ヒト $\alpha 7$  nAChRサブユニットを発現する細胞を準備し、試験化合物と該細胞とを一緒にし、細胞傷害性の指標に関して該細胞をモニターすることを含む。変異nAChRサブユニットの自発的作用を制御する必要がある場合には、それを、誘導プロモーターの制御下の組換え哺乳類細胞系（例えば、イソプロピルチオガラクトシド（「IPTG」）により誘導可能なLacSwitch系）内で安定に発現させることができる。変異 $\alpha 7$  nAChRサブユニット発現は、IPTGの添加により誘導されるまでは低レベルで維持されるであろう。

あるいは、誘導プロモーターの存在下または不存在下、該トランスフェクト化細胞を、細胞傷害性作用を妨害または軽減する $\alpha 7$  nAChRブロッカー（例えば、メ

チルリカコニチン（「MLA」）またはメカミラミン）の存在下で培養することが可能であろう。どちらのブロッカーも可逆的であり、該ブロッカーを洗い落とした後の $\alpha 7$  nAChRの機能に対する試験化合物の効果の測定が可能である。

細胞保護性化合物は、それが細胞死を軽減しうることにより同定することができる。一方、細胞傷害性化合物は、それが細胞死を促進しうることにより同定することができる。これらの効果が変異体または野生型の $\alpha 7$  nAChRサブユニットにより媒介されることは、 $\alpha 7$  nAChRブロッカーが該効果を妨げうることにより確認することができる。細胞死または細胞傷害性は、培養内の細胞の数または密度の測定、細胞増殖速度の測定（例えば、標識されたヌクレオチドまたはアミノ酸の取込み）、または例えば色素の取込み（例えば、トリパンブルーは、健常細胞により排除される）もしくはラクトースデヒドロゲナーゼ（LDH）などの細胞質構成成分の放出による細胞の無傷性の測定を含む（これらに限定されるものではない）種々の技術により

モニターすることができる。また、細胞保護物質は、それが変異nAChRを野生型nAChRより著しく拮抗する能力に関して、あるいは野生型nAChRと比べて変異nAChRの減衰速度をそれが増加させる能力に関して、後記実施例に記載の方法でスクリーニングすることができる。

また、変異体サブユニットを発現するnAChR DNA用のオリゴヌクレオチドプローブを設計するために、該DNAまたはそれに由来するRNAを使用することができる。本発明で用いる「プローブ」なる語は、標的ポリヌクレオチド中に存在する核酸配列に相補的な核酸配列を含有する前記ポリヌクレオチドからなる構造体を意味する。プローブのポリヌクレオチド領域は、DNAおよび/またはRNAおよび/または合成オリゴヌクレオチド類似体からなることが可能である。そのようなプローブは、 $\alpha 7$  変異体を野生型メッセージから識別するためのインビトロハイブリダイゼーションアッセイにおいて有用であろう。ただし、変異体と野生型との間のコーディングの相違が僅かな場合には、そのような識別を行ないうる方法を設計することは困難かもしれない。あるいは、配列分析のためにサンプルRNAまたはDNAを増幅するために、PCRに基づくアッセイを用いることが可能

であろう。

さらに、当技術分野でよく知られている技術を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体を調製するために、変異nAChRサブユニットを使用することができる。変異nAChRサブユニットまたは関連断片は、後記で概要説明する組換え技術を用いて得ることができる。すなわち、該サブユニットまたは断片を発現する組換え細胞を培養して、大量の該サブユニットまたは断片を得、それを回収し、単離することができる。あるいは、変異nAChRサブユニットまたはその断片は、後記の通常のポリペプチド合成技術を用いて合成することができる。変異nAChRサブユニットに対して特異性および選択性を示すモノクローナル抗体は、測定可能かつ検出可能な部分（例えば、蛍光部分、放射能標識、酵素、化学発光標識など）で標識し、インビトロまたはin situ免疫蛍光アッセイなどで使用することができる。免疫診断を目的として変異nAChRサブユニットを同定するために、該抗体を使用することができる。

以下は、本発明を実施するための特定の実施形態の実施例である。これらの実施例は、もっぱら例示を目的として記載されており、本発明の範囲を何ら限定するものではない。実施例の

記載にあたっては、使用している数字（例えば、量、温度など）に関する精度を保証するために種々の配慮がなされているが、もちろん、ある程度の実験誤差および偏差が考慮されるべきである。

#### 材料

塩化アセチルコリン（「ACh」）、コラゲナーゼ1A型、塩化d-ツボクラリン（「dTC」）、ゲンタマイシンおよび塩酸メカミラミン（「MEC」）は、Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri, U.S.A.) から入手した。臭化水素酸ジヒドロ-β-エリスロイジン（「DHBE」）およびクエン酸メチルリカコニチン（「MLA」）は、Research Biochemicals International (Natick, Massachusetts, U.S.A.) から入手した。トリカイン（3-アミノ安息香酸エチルエステルメタンスルホナート；Finquel）は、Argent Chemical Laboratories (Fisheries Chemical Division, Redmond, Washington, U.S.A.) から入手した。

#### ヒト $\alpha$ 7野生型cDNAの調製

Elliottら (1993) Soc. Neurosci. Abstr. 19:69で報告されている完全なヒトシグナルペプチド (MRCSPGGVWLALAASLLHVALQGEF (配列番号3)) を含むよう、Ducette-Stammら (1993), 前掲

で報告されているヒト $\alpha$ 7 nAChRサブユニットcDNAを修飾した。以下のオリゴヌクレオチドを合成した: 5'-GGGGGCAGCACTCGAGCCCATGAGGTGTAGCCCCGAGGAGTGTGGCTGGCACTGGCAGCATCTCTCCTGCACGTGTCCTGCAAGGCGAGTTCAGAGGAAGCTTTACAAGGAGGGG-3' (配列番号4)。このオリゴヌクレオチドは、XhoI制限部位 (イタリック体) およびATG開始コドン (太字) ならびにそれに続く28コドンのヒト $\alpha$ 7 nAChRサブユニットcDNA配列を含有する。それは、完全なシグナルペプチドをコードし、該 $\alpha$ 7 nAChRサブユニットcDNA内に存在するHind III部位 (下線部) まで伸長する。XhoIおよびHindIII部位は、追加的ヌクレオチドに隣接しており、そのためそれらは該分子の内部に位置する。さらに、このオリゴヌクレオチドの逆相補体を合成した。それらのオリゴヌクレオチドと一緒にアニーリングさせ、XhoIおよびHindIIIで消化し、ついで、予めXhoIおよびHindIIIで消化されたヒト $\alpha$ 7サブユニットcDNA含有するpBluescriptベクター内に連結した。これにより、完全長ヒト $\alpha$ 7 nAChRサブユニットをコードする新たなcDNAを得た。その新たなcDNAの配列は、ジデオキシシークエンシングにより確認した。該cDNAをXhoIおよびNotIでpBluescriptから切り出し、該5' 突出部をクレノウポリメラ

ーゼで埋め、BstXIアダプターと結合させ、BstXIで消化し、pRcCMVベクター (Invitrogen) のBstXI部位内に連結した。発現ベクター内のインサートの配向は、 $\alpha$ 7 nAChRサブユニットcDNAを非対称位置で切断する酵素での制限分析により決定した。

#### アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵母細胞内での $\alpha$ 7 nAChRの発現および機能特性の測定

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵母細胞の調製、受容体RNAまたはDNAの注入、および2電極電圧固定による $\alpha$ 7 nAChR応答の測定は、アトロピンが裕



溶液中に通常は存在しないこと以外は野生型ヒト  $\alpha 7$  nAChR に関して既に記載されている方法(Briggsら(1995), 前掲)に従った。卵母細胞は、100g/mlゲンタマイシンを含有する通常のBarth溶液 (90mM NaCl, 1mM KCl, 0.66mM NaNO<sub>3</sub>, 0.74mM CaCl<sub>2</sub>, 0.82mM MgCl<sub>2</sub>, 2.4mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.5mMピルビン酸ナトリウムおよび10mM Na N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸) (「HEPES」) バッファー、最終pH7.55) 中、17~18℃に維持した。応答は、10mM BaCl<sub>2</sub>を含有しCaCl<sub>2</sub>およびMgCl<sub>2</sub>を欠く改変Barth溶液中、-60mVの保持電位で測定した。しかしながら、いくつかの実験では(図6)、応答電流-電圧関係を測定するために細胞電位を

意図的に変化させ、また、ニワトリ  $\alpha 7$  nAChRを研究するためにGalziら(1992), 前掲で用いられている条件を追試するために、OR2およびアトロピン (82.5mM NaCl, 2.5mM KCl, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM Na-HEPES(pH7.4)および0.5M硫酸アトロピン) を使用した。コンピューター制御された電磁弁と該卵母細胞から200~400m以内に配置されたプッシュ/プル・アプリケーションターを用いて、アゴニストをしばらくの間適用した。アゴニストの適用と同時に、コンピューターにより応答を記録した。アゴニストと共にアンタゴニストを該プッシュ/プル・アプリケーションター内に含有させ、アゴニストの適用の前に少なくとも3分間、過融解により浴槽に適用した。最大振幅を測定することにより、応答を定量した。

ヒト  $\alpha 7V274T$  の応答は、ヒト  $\alpha 7WT$  の応答とは異なり、実験中に有意に増加する傾向にあった。したがって、実験的試行を、同じ卵母細胞における10M AChの対照適用により、前後で一括して扱った。該実験における感受性の変化および卵母細胞間での受容体発現の変動性を説明するために、10M AChの応答に対して全応答を正規化した。

#### 実施例 1

##### ヒト $\alpha 7V274T$ cDNAの調製

発現ベクター内で変異  $\alpha 7V274T$  を生成させるために、野生型  $\alpha 7$  nAChRサブユニット遺伝子をEcoRVおよびKpnI制限酵素で消化し、その消化されたセグメント

を後記方法による連結により突然変異PCR産物で置換した。

図1に図示した方法においては、2つのPCR工程を行ない、ついで制限酵素で消化して野生型 $\alpha 7$  nAChRサブユニットcDNAの突然変異断片を得、該突然変異断片を野生型 $\alpha 7$  cDNA内にサブクローニングした。第1工程(A)では、所望の突然変異を保持する2つのDNA断片を、適当なプライマーを使用するPCRにより生成させた。該突然変異ヌクレオチドを、長い方の断片ではリバースプライマー(X-3')内に、短い方の断片ではフォワードプライマー(Y-5')内に取込ませた。最終PCR産物がEcoRVおよびKpnI制限部位を含有するように、それらの2つの外部プライマー(X-5'およびY-3')を選択した。

長い方の5'断片は、フォワード外部プライマー5'-GTTTGGGTCCTGGTCTTACG-3' (配列番号5)と該突然変異を保持するリバース内部プライマー5'-GCAGCATGAAGGTGTAAGAGAG-3' (配列番号6)とを使用して生成させた。短い方の3'断片は、同様

に該突然変異を保持するフォワード内部プライマー5'-CTCTCTTACCACCTTCATGCTGC-3' (配列番号7)とリバース外部プライマー5'-GTACTGCAGCAGCATCACCG-3' (配列番号8)とを使用して生成させた。PCRの条件は、100ngの投入 $\alpha 7$  DNA、2×Pfuバッファー、100ngの各プライマー対および0.625UのPfu酵素(Stratagene, La Jolla, CA)よりなるものであった。反応は、Perkin-Elmer9600中、95℃で24秒間、60℃で22秒間、ついで72℃で78秒間の20サイクルで行なった。

第2PCR工程(B)では、該外部プライマーを使用して、これらの2つの断片を再合体させた。該配列を再増幅し、所望の突然変異を保持する長い方のDNA断片を生成させた。

次工程(C)では、工程(B)の産物をKpnIおよびEcoRVで消化し、ゲル精製し、予めKpnIおよびEcoRVで消化された野生型ヒト $\alpha 7$  cDNA内に連結した。最終cDNAのジデオキシシーケンシングは、所望の突然変異の存在を示し、また、該PCR過程中に他の突然変異が全く導入されていないことを示した。

図2A~2Cは、ヒト $\alpha 7$ V274T cDNA突然変異体のヌクレオチド配列(配列番号1)を示す。ヒト $\alpha 7$ V274T変異体のアミノ酸配列(配列番号2)も、図2A~2Cに示されている。

## 実施例 2

### ヒト $\alpha 7V274T$ および野生型 nAChR におけるアゴニストに関する濃度-応答関係

前記のとおりアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵母細胞内に注入した実施例 1 で調製した DNA から発現したヒト  $\alpha 7V274T$  nAChR サブユニットを使用して、種々のアゴニスト濃度に対する応答を測定した。該応答は、最大振幅にて測定し、10 nM ACh に対する応答に対して正規化した。データ点 (図 3) は、正規化応答 (ACh では  $n=4\sim 10$ 、(-)-ニコチンでは  $n=3\sim 4$ 、GTS-21 では  $n=3\sim 5$ 、ABT-089 では  $n=2\sim 5$ ) の平均  $\pm$  s. e. m. を示す。図 3 に示す曲線は、 $\alpha 7$  野生型における GTS-21 および ABT-089 に対する小さな応答を除いて該データ (Shigmaplot ソフトウェア, Jandel Scientific, San Rafael, California, U.S.A.) にあてはめたヒル式を示す。ヒト  $\alpha 7$  野生型 nAChR において、ACh および (-)-ニコチンは、それぞれ  $15.6 \pm 20 \mu\text{M}$  および  $83 \pm 10 \mu\text{M}$  の  $EC_{50}$  値、およびそれぞれ  $0.94 \pm 0.09$  および  $1.2 \pm 0.2$  のヒル係数を有していた。GTS-21 および ABT-089 は、応答が弱すぎて評価できない  $EC_{50}$  値を有する部分アゴニストであった。ヒト  $\alpha 7V274T$  nAChR における効力および効能の明らかな変化があった。

ヒト  $\alpha 7V274T$  nAChR においては、ACh および (-)-ニコチンは 2 桁強力であり、それぞれ  $1.02 \pm 0.04 \mu\text{M}$  および  $0.94 \pm 0.12 \mu\text{M}$  の  $EC_{50}$  値、およびそれぞれ  $1.8 \pm 0.2$  および  $1.3 \pm 0.2$  のヒル係数を有していた。さらに珍しいことには、GTS-21 は、ヒト  $\alpha 7$  野生型 nAChR におけるその弱い部分アゴニスト効果とは全く対照的に、ヒト  $\alpha 7V274T$  nAChR においては完全アゴニストであり、 $4.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$  の  $EC_{50}$  値、および  $1.5 \pm 0.1$  のヒル係数を有していた。また、ABT-089 は、ヒト  $\alpha 7V274T$  nAChR において、より強力かつ有効であり、 $28 \pm 3 \mu\text{M}$  の  $EC_{50}$  値、および  $2.3 \pm 0.4$  のヒル係数を有していたが、それは、 $40 \pm 1\%$  の効能を有する部分アゴニストであった。ヒト nAChR サブユニットでのこれらの結果は、ニワトリ  $\alpha 7V251T$  においてはニワトリ  $\alpha 7$  野生型 nAChR と比べて ACh の 180 倍の増加が認められること (Galzi ら (1992), 前掲) と相関している。しかしながら、これは、(-)-ニコチンの効力もまた変化することの初めての証明であり、また、この変異体において部分アゴニストの効力および効能が変化することの初めての証明である。

### 実施例 3

#### 野生型ヒト $\alpha 7$ WT nAChRと比較したヒト $\alpha 7V274T$ の活性化および減衰速度

AChの $EC_{50}$ 濃度（それぞれ $1\mu M$ および $200\mu M$ ）に対するヒト  $\alpha 7V274T$ およびヒト  $\alpha 7WT$ の応答は、同様の振幅になる点で対等であり、ACh適用の開始時と同調させ同等のベースライン保持電流に関して補正して示されている（図4）。AChは、ヒト  $\alpha 7V274T$ には10秒間、ヒト  $\alpha 7WT$ には2.5秒間適用した。ヒト  $\alpha 7WT$ のトレースの初めと終わり付近の短時間のスパイク状のチック（tics）は、アゴニスト適用弁の開口および閉鎖を示す電氣的アーチファクトである。

ヒト  $\alpha 7V274T$ の応答は、ヒト  $\alpha 7WT$ の応答と比べて遅く活性化され減衰した。同様に、類似したニワトリnAChRは、AChに応答して、より遅く活性化され減衰した（Galziら（1992），前掲）。

### 実施例 4

#### ヒト $\alpha 7V274T$ nAChRにおけるアゴニスト活性に関するnAChRアンタゴニストの評価

ジヒドロ- $\beta$ -エリスロイジン（DH $\beta$ E）、d-ツボクラリン、ヘキサメトニウムなどのnAChRアンタゴニストは、アゴニストと

して適用された場合に、ニワトリ  $\alpha 7TM-2$  nAChR変異体における応答を活性化することが判明している（Bertrandら（1992），前掲）。これは、単一チャンネル記録からのデータと共に、（a）変異nAChRが受容体脱感作状態において伝導すること、および（b）野生型nAChRアンタゴニストが、該脱感作状態を安定化することにより作用することを示唆している（Bertrandら（1992），前掲）。

ヒト  $\alpha 7V274T$  nAChRにおいては、DH $\beta$ E（ $10\mu M$ ）もまた、アゴニスト様内向き電流応答を活性化した（図5を参照されたい）。しかしながら、 $10\mu M$  DH $\beta$ EがACh応答の66%もの大きさの応答を惹起した相同なニワトリ  $\alpha 7V251T$  nAChR（Bertrandら（1993））とは異なり、これらの応答は小さく、 $10\mu M$  AChに対する応答の2.8%～6.9%の範囲であった（表1）。チャンネルドメインM2内の2つの異なる部位での突然変異は、ニューロン  $\alpha 7$  ニコチン性受容体のカルシウム透過性を改変する（Proc. Natl. Acad. Sci (U.S.A.) 90:6971-6975）。

さらに、ヒト $\alpha 7V274T$ においては、これは、nAChRアンタゴニストの一般的特性ではなかった。図5および表1に示すとおり、 $\alpha 7$ 選択的アゴニストであるMLA (10nM) および非選択的

nAChRアンタゴニストであるメカミラミン (10 $\mu$ M) は共に、反対の作用 (すなわち、AChに対する最大内向き電流応答の0.9%~12.4%の範囲の振幅の小さなインバースアゴニスト様外向き電流) を惹起した。図5に示すトレース (すべて、単一の卵母細胞からのものである) では、それぞれ20秒間適用されたメカミラミン (MEC, 10 $\mu$ M)、メチルリカコニチン (MLA, 10nM)、ジヒドロ- $\beta$ -エリスロイジン (DH $\beta$ E, 10 $\mu$ M) および浴溶液 (0アゴニスト対照) に対する応答が比較されている。小さな0アゴニスト対照の応答は、各ヒト $\alpha 7V274T$ 卵母細胞において測定し、データをまとめる際にアゴニスト応答から差し引いた。図5の基準線は、すべてのトレースに関する10nAおよび2秒間を表す。

表1

ヒト $\alpha 7V274T$ 突然変異体および $\alpha 7$ 野生型nAChRにおけるコリン作動性アンタゴニストの効果

| nAChR           | リガンド<br>( $\mu$ M) | 活性化率(%) <sup>†</sup><br>10 $\mu$ M ACh | 阻害率(%) <sup>§</sup>           |                               |
|-----------------|--------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|
|                 |                    |  | 1 $\mu$ M ACh                 | 10 $\mu$ M ACh                |
| $\alpha$ 7V274T | DH $\beta$ E (10)  | 4 $\pm$ 1 (4)*                         | 69 $\pm$ 5 (4) <sup>†</sup>   | 52 $\pm$ 6 (4) <sup>†</sup>   |
|                 | d-TC (1)           | -2 $\pm$ 1 (4)                         | 99 $\pm$ 1 (4) <sup>†</sup>   | 97 $\pm$ 3 (3) <sup>†</sup>   |
|                 | MLA (0.01)         | -4 $\pm$ 2 (7)*                        | 103 $\pm$ 1 (4) <sup>†</sup>  | 95 $\pm$ 3 (7) <sup>†</sup>   |
|                 | MEC (10)           | -1.9 $\pm$ 0.2 (4) <sup>†</sup>        | 101 $\pm$ 1 (4) <sup>†</sup>  | 53 $\pm$ 2 (4) <sup>†</sup>   |
|                 | ATROP (2)          | 0.1 $\pm$ 0.1 (4)                      | 28 $\pm$ 7 (5)*               | 13 $\pm$ 5 (6) <sup>†</sup>   |
|                 |                    | 10mM ACh に<br>対する割合(%)                 | 200 $\mu$ M ACh に<br>対する割合(%) | 10mM ACh に<br>対する割合(%)        |
| $\alpha$ 7WT    | DH $\beta$ E (10)  | -0.2 $\pm$ 0.1 (5)                     | 41 $\pm$ 10 (4)*              | 23 $\pm$ 2 (4) <sup>†</sup>   |
|                 | d-TC (1)           | -0.1 $\pm$ 0.1 (5)                     | 28 $\pm$ 2 (4) <sup>†</sup>   | 25 $\pm$ 3 (4) <sup>†</sup>   |
|                 | MLA (0.01)         | -0.2 $\pm$ 0.4 (3)                     | 100 $\pm$ 0.5 (4)             | 99 $\pm$ 0.4 (4) <sup>†</sup> |
|                 | MEC (10)           | -0.3 $\pm$ 0.2 (3)                     | 82 $\pm$ 1 (3) <sup>†</sup>   | 85 $\pm$ 3 (3) <sup>†</sup>   |
|                 | ATROP (2)          | 0.2 $\pm$ 0.5 (3)                      | 4 $\pm$ 3 (3)                 | 12 $\pm$ 3 (3)*               |

略語：DH $\beta$ E (ジヒドロ- $\beta$ -エリスロイジン)；d-TC (d-ツボクラリン)；MLA (メチルリカコニチン)；MEC (メカミラミン)；ATROP (アトロピン)。

\*  $p < 0.05$  (0に対するもの) (スチューデントの両側 t 検定)

†  $p < 0.005$  (0に対するもの) (スチューデントの両側 t 検定)

‡ 10  $\mu$ M による活性化との比較

§ ACh に対する応答の阻害率 (%)

また、d-ツボクラリン (1  $\mu$ M) は、アゴニスト様内向き電流を惹起しなかったが、小さな外向き電流 (ACh に対する最大内向き電流応答の3~5%) を惹起した (4個中2個のヒト  $\alpha$ 7V274T 卵母細胞において)。該外向き電流応答は、静止 (閉鎖) 状態の安定化または自発的開口 nAChR のチャンネル遮断によるものである可能性がある。同様の条件下のヒト  $\alpha$ 7WT nAChR においては、DH $\beta$ E (10  $\mu$ M)、MLA (10  $\mu$ M)、メカミラミン (10  $\mu$ M) および d-ツボクラリン (1  $\mu$ M) のいずれも、有意な内向き又は外向き電流応答を全く惹起しなかった (表1)。ムスカリン性アンタゴニストであるアトロピン (2  $\mu$ M) は単独では、nAChR においてほとんど作

用しなかった。

#### 実施例 5

##### ヒト $\alpha$ 7V274T nAChRにおけるアゴニスト活性に関するnAChRアンタゴニストの評価

また、前記化合物を、ヒト  $\alpha$ 7V274T nAChRおよびヒト  $\alpha$ 7WTの両方におけるnAChRに対する応答のアンタゴニストとして評価した。それぞれのnAChRについて、2種類の濃度のAChを使用した。1つは、 $EC_{50}$ 値付近のもの ( $\alpha$ 7V274では $1\mu M$ 、および $\alpha$ 7WTでは $200\mu M$ ) であり、もう1つは、最大応答レベ

ル付近のもの ( $\alpha$ 7V274Tでは $10\mu M$ 、および $\alpha$ 7WTでは $10mM$ ) であった。表1にデータを示す。DH $\beta$ E ( $10\mu M$ )、d-ツボクラリン ( $1\mu M$ )、MLA ( $10nM$ ) およびメカミラミン ( $10\mu M$ ) は、両方のnAChRにおいてアンタゴニストとして作用した。予想どおり、 $\alpha$ 7選択的アンタゴニストであるMLAは特に強力であり、ヒト  $\alpha$ 7V274Tおよびヒト  $\alpha$ 7WTを $10nM$ の濃度で遮断した。興味深いことに、メカミラミン ( $10\mu M$ )、DH $\beta$ E ( $10\mu M$ ) およびd-ツボクラリン ( $1\mu M$ ) はそれぞれ、ヒト  $\alpha$ 7WTよりもヒト  $\alpha$ 7V274Tを阻害したようである。アトロピン ( $2\mu M$ ) は、 $1\mu M$  AChに対するヒト  $\alpha$ 7V274Tの応答を28%阻害したが、 $200\mu M$  AChに対するヒト  $\alpha$ 7WTの応答にはほとんど影響を及ぼさなかった。いくつかの卵母細胞は、低いマイクロモル濃度のAChにより活性化される内在性ムスカリン受容体を有する (Kusanoら (1982) J. Physiol. (London) 328:143-170; Davidsonら (1991) FEBS Lett. 284:252-256; および Dascalら (1980) Life Sci. 27:1423-1428)。しかしながら、これは、ヒト  $\alpha$ 7V274Tに対するアトロピンの作用を説明することにならないようである。なぜなら、nAChRアンタゴニストであるメカミラミン ( $10\mu M$ ) は、アトロピンにより阻害されたh- $\alpha$ 7V274T卵母細胞の5個中3個におい

て、 $1\mu M$  AChに対する応答を完全に遮断したからである (残りの2個は、メカミラミンにさらされなかった)。

DH $\beta$ E ( $10\mu M$ ) は、それが $EC_{50}$ ACh応答を阻害するより弱く、ヒト  $\alpha$ 7V274Tおよびヒト  $\alpha$ 7WTにおいて最大ACh応答を阻害した (表1を参照されたい)。また、メカミラミン ( $10\mu M$ ) は、ヒト  $\alpha$ 7V274T nAChRにおいては、 $EC_{50}$ ACh応答より弱

く最大ACh応答を阻害したが、ヒト $\alpha 7$ WT nAChRにおいては、そうではなく、メカミラミンは両方の濃度のAChを同様に阻害した。より高い濃度のAChにおけるより弱い阻害は、競合的なアンタゴニスト-アゴニスト相互作用を表している可能性がある。

したがって、ヒト変異 $\alpha 7V251T$  nAChRは、アゴニストの活性化に対するその感受性が増加しており、活性化および脱感作化の見掛け速度がより遅い点においては、類似ニワトリ $\alpha 7V251T$  nAChRと類似している。しかしながら、それらの受容体は、DH $\beta E$  (10  $\mu M$ ) が、ニワトリ $\alpha 7V251T$ における66%のアゴニスト様効果と比べて、ヒト $\alpha 7V274T$ 内向き電流を弱くしか活性化しなかった点においては、また、d-ツボクラリンが、ニワトリ $\alpha 7L247T$  nAChRにおける完全な応答と比べて、h- $\alpha 7V274T$ において内向き電流を活性化しなかった点においては異なっている

(Galziら(1992), 前掲; Bertrandら(1993), 前掲)。したがって、 $\alpha 7$  nAChR機能に対するこれらの配列修飾の効果において種間相違が存在する可能性があり、ニワトリ $\alpha 7V274T$ に関する公知情報を考慮すると、その相違は予想外である。

#### 実施例 6

##### ヒト $\alpha 7V274T$ 整流性

10  $\mu M$  AChに対するヒト $\alpha 7V274T$ 変異nAChRの応答の電流対電圧の関係は、Briggsら(1995) *Neuropharmacol.* 34:583-5902に記載の電極電圧固定下、卵母細胞において測定した。これは、以下の2つの条件下で行なった: (a)  $Ca^{2+}$ 依存性 $Cl^-$ 電流の二次活性化を妨げるために $Ba^{2+}$ を含有する改変Barth溶液 (90mM NaCl, 1 mM KCl, 0.66mM  $NaCO_3$ , 10mM  $BaCl_2$ , 2.5mM ビルビン酸ナトリウムおよび10mM Na-HEPES, pH7.55) (Briggsら(1995), 前掲に記載) 中の4個の卵母細胞、および (b) Galziら(1992) *Nature* 359:500-505において彼らのニワトリ $\alpha$ 変異体の研究で使用されているものを追試するために調製したOR2溶液 (82.5mM NaCl, 2.5mM KCl, 2.5mM  $CaCl_2$ , 1mM  $MgCl_2$ , 0.5  $\mu M$  アトロピンおよび5mM Na-HEPESバッファ, pH7.4) 中の3個の卵母細胞。どちらの条件下においても、負の細胞電位におけ



る電流応答と比べて、0mVを超える細胞電位においては電流応答がほとんど存在しなかった点で、ACh応答の、明らかな内向き整流性が認められた。同様に、ヒト $\alpha 7$ 野生型nAChR (Briggsら(1995), 前掲) およびニワトリ $\alpha 7$ 野生型nAChR (Galziら(1992), 前掲) は内向き整流性を示すが、ニワトリ $\alpha 7V251T$ 変異体は、そのような整流性を示さなかった(Galziら(1992), 前掲)。

#### 実施例 7

##### 哺乳類細胞系における発現研究

高レベルの構成的発現のためのヒトサイトメガロウイルス由来のプロモーター配列を含有しゲネティシン (geneticin) 耐性の安定な細胞系の選択のためのネオマイシン耐性遺伝子を含有する真核性発現ベクターpRc/CMV (Invitrogen, San Diego, CA) を用いて、ヒト $\alpha 7$ 野生型 (WT) および $\alpha 7V274T$ 突然変異nAChRをヒト胎児腎細胞系HEK-293内にトランスフェクトした。該cDNAは、Gopalakrishnanら (1995) Eur. J. Pharmacol. (Mol. Pharm.) 290:237-246に記載のリボフェクタミン (GIBCO) を用いてトランスフェクトする。このアプローチを用いて、ヒト $\alpha 7WT$  nAChRを発現する安定な細胞系が作製されており、これは、

明らかな $[^{125}I]$  $\alpha$ -ブンガロトキシン結合、アセチルコリンに誘起された電流、および $Ca^{2+}$ 流入応答を示す (Gopalakrishnanら(1995), 前掲; Delbonoら (1996) J. Pharmacol. Exp. Ther. (印刷中))。また、図7に示す初期データは、哺乳類細胞内への $\alpha 7$ 変異体のトランスフェクションの実現可能性を示している。

ヒト $\alpha 7V274T$ 変異体は、ニコチン性アンタゴニストにより阻害されるメカニズムを介して細胞傷害性になると考えられるシーエレガンス (*C. elegans*) deg-3 (u662) の自発的突然変異に対する相同性を保持する (TreininおよびChalfie (1995) Amutated acetylcholine receptor subunit causes neuronal degeneration in *C. elegans*. Neuron 14:871-877)。ヒト $\alpha 7V251T$ 変異nAChRの応答は、野生型の応答より持続的であるが (図4)、ニワトリ $\alpha 7V251T$ 変異nAChRと同様に、おそらく高い $Ca^{2+}$ 透過性を有していて、該受容体の活性化が、ある条件下では、過剰な $Ca^{2+}$ 流入を引き起こし、したがって細胞死を招く。さらに、 $\alpha 7V274T$ を3日間以上発現している卵母細胞は、ヒト $\alpha 7$ 野生型nAChRを発現する卵母細胞よ

り10~100倍、電氣的に漏出性であったため、ヒト $\alpha 7V274T$ 変異nAChRが、延長した自発的開口の傾向を有している可能性があるという幾つかの証

拠がある。したがって、ヒト $\alpha 7V274T$ および関連変異nAChRは、アゴニストの存在下、および不存在下においても、細胞傷害性である可能性がある。そのような変異体の自発的発現は、正常な $\alpha 7$  nAChR機能を妨げ、未熟細胞死を誘導し、あるいはシナプス形成を妨げる可能性がある。そのような効果は、コリン作動性機能の障害を伴ういくつかの形態の神経変性疾患または他の障害を引き起こす可能性がある。

細胞傷害性は、 $\alpha 7V274T$ 変異体を高レベルで発現する細胞の能力を明らかに制限しうる。これを回避するために、トランスフェクトされた細胞を、可逆的ニコチン性アンタゴニストまたはチャンネルブロッカー（例えば、メチルリカコニチンまたはメカミラミン）の存在下で増殖させる。そのような物質は、該受容体またはチャンネルを遮断することにより細胞傷害性を妨げると考えられるが、該細胞を更なる実験で使用する直前に除去することが可能であろう。

別法として、誘導物質を加えるまでは $\alpha 7$ サブユニットの発現が抑制されるようにするために誘導発現系を用いて、ヒト $\alpha 7$ 野生型または変異体をトランスフェクトする。誘導系の利点は、それが、pRcCMVなどの構成的発現系を用いる場合に認められる

発現タンパク質（例えば、ヒト $\alpha 7V274T$ 変異体）の細胞傷害性効果を除去しうることである。

使用する発現ベクターの1つはLacSwitch系（Stratagene）であり、これは、遺伝子発現を制御するためにラクトースオペロンの要素を用いる。LacSwitch系の場合、抑制状態では基底発現が非常に低い、一旦、細胞系内に安定にトランスフェクトされると、この系は、誘導剤IPTGの存在下、4~8時間以内の迅速な誘導を可能にする。該系は、クローニングにより $\alpha 7$ サブユニット構築物を挿入する真核性Lacリプレッサー発現ベクター（p3' SS）および真核性lac-オペレーター含有ベクター（pOPRSVI-CAT）を用いる。抗生物質選択は、p3' SS内のハイグロマ

イシン耐性遺伝子を介して、また、pOPRSVI-CATベクター内のネオマイシン耐性遺伝子を介して達成される。HEK-293または他の細胞のトランスフェクションの後、安定な細胞系の選択がハイグロマイシンおよびゲネティシンの存在により達成される。安定な細胞系を単離したら、誘導剤IPTGを加えることにより $\alpha 7$ サブユニットを発現させる。IPTGの非存在下では、pOPRSVT-CATベクター内のオペレーターに対するLacリプレッサータンパク質の結合により転写が阻止される。IPTGは、オペ

レーターに対するLacリプレッサータンパク質の結合親和性を減少させ、それにより、挿入された $\alpha 7$ サブユニット遺伝子の転写および発現を誘発する。そのような系の選択により、インビトロでの細胞死の媒介における突然変異体 $\alpha 7$  nAChRの役割の直接的な評価が可能となる。

#### 哺乳類細胞系における細胞傷害性のインビトロでの評価

ヒト $\alpha 7$  V274T変異体が細胞傷害性を媒介するか否かを判定するためには、HEK-293細胞内での該cDNAの一過性発現の後、多数の方法、例えば、(i)トリパンブルー（4%）で細胞を5分間染色し、生存細胞が該色素を排除する能力を評価することにより、(ii)培地内に放出された細胞質酵素ラクトースデヒドロゲナーゼ（LDH）のレベルを、細胞溶解の指標として測定することにより（例えば、Donnelly-Robertsら（1996）Brain Res. 719:36-44）、(iii)生存性の指標としての、中性赤色素の取込み、またはテトラゾリウムMTTの取込みおよび変換により（例えば、Littleら（1996）Br. J. Dermatol. 134:199-207;DSouzaら（1996）J. Neurosci. Res. 43:289-298;Malcolmら（1996）J. Neurochem. 66:2350-2360）、(iv)核酸へのヨウ化プロビジウムの取込みおよび結合（例えば、Wrobelら（1996）J.

Immunol. Methods 189:243-249）、または原形質膜の完全性または細胞代謝機能の喪失に対して感受性を示す他の技術により、細胞傷害性を評価することができる。ヌクレオチドの取込み、DNAの構造または完全性の変化を評価するために、追加的な技術を用いることが可能である（例えば、AlisonおよびSarraf（1995）

Hum. Exp. Toxicol. 14:234-247;Didierら (1996) J.Neurosci. 16:2238-2250)。  
これらの技術は当業者に公知である。これらの研究は、未トランスフェクト化  
または模擬トランスフェクト化細胞（対照）、ヒト $\alpha 7$ 野生型でトランスフェク  
トされた細胞、およびヒト $\alpha 7V274T$ 変異体でトランスフェクトされた細胞におい  
て行なう。ヒト $\alpha 7V274T$ 変異体の発現が細胞傷害性につながることを確認され  
ば、インビボでの神経変性過程の誘発における役割が示唆される。

#### 診断用途

ヒトにおける $\alpha 7V274T$ 変異体の存在は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）  
および血液サンプルから単離されたゲノムDNAを標準的な方法に従い使用して  
、非侵襲的に判定することが可能であろう。あるいは、RNAを単離する場合には  
、 $\alpha 7$ 変異体を検出するために逆転写PCR（「RT-PCR」）を用いることが

できる。例えば、該PCR反応では、標準的な $50 \mu l$ のPCR反応において、適当な合  
成プライマーと共に100ngの該DNAを使用することが可能であろう。 $\alpha 7$ 変異体の  
合成で使用する外部プライマー（X-5'およびY-3'）は、関心のある領域の増幅を  
可能にするであろう。V274T置換が生じる配列膜貫通セグメント2を含む異なるサ  
イズの断片を生成するように、該プライマーを選択する。増幅後、該メッセージ  
のヌクレオチド配列を決定する。該変異体の存在は、神経変性または他の形態の  
細胞傷害性などの細胞性疾患の指標となりうる。

したがって、試験サンプル中のヒト変異 $\alpha 7$ サブユニットの標的ポリヌクレオ  
チドを検出する方法は、（a）ヒト変異 $\alpha 7$ サブユニットの標的ポリヌクレオチ  
ドを少なくとも1つのヒト変異 $\alpha 7$ サブユニット特異的ポリヌクレオチドプロー  
ブまたはその相補体と接触させ、（b）該試験サンプル中の標的ポリヌクレオチ  
ドとプローブとの複合体の存在を検出することを含む。試験サンプル中のヒト $\alpha$   
7サブユニットmRNAのcDNAを検出するためのもう1つの方法は、（a）逆転写を  
行なってcDNAを得、（b）工程（a）で得たcDNAを増幅し、（c）試験サンプル中  
のヒト変異 $\alpha 7$ サブユニットの存在を検出することを含む。ある

いは、サンプリングしたDNA、またはRT-PCRによりRNAから調製したcDNAを、ヌク

レオチド配列分析による変異体の検出を可能にする適当なプライマー（例えば、X-5' および Y-3'）を使用して増幅することができる。検出工程（c）は、測定可能なシグナルを生成しうる検出可能な部分を使用することを含む。

ヒト変異 $\alpha$ 7サブユニットの核酸に選択的にハイブリダイズしうる、ヒト変異 $\alpha$ 7サブユニットに由来する精製されたポリヌクレオチド（該ポリヌクレオチドは、配列番号1またはその一部を含む配列を有する）またはその断片を、これらの方法において使用することができる。該精製ポリヌクレオチドは、組換え技術により製造することができる。

また、ヒト変異 $\alpha$ 7サブユニットにコードされるポリペプチドは、診断用途に有用である。該ポリペプチドは、配列番号2またはその一部を含むアミノ酸配列を有し、組換えまたは合成技術により製造することができる。

また、ヒト変異 $\alpha$ 7サブユニットに特異的に結合するモノクローナル抗体も、これらの方法で使用することができる。ヒト変異 $\alpha$ 7サブユニットは、配列番号2またはその一部のアミノ酸配列を含む。

試験サンプル中のヒト変異 $\alpha$ 7サブユニットを検出するための方法は、（a）ヒト変異 $\alpha$ 7サブユニットに特異的に結合する抗体またはその断片と該試験サンプルとを、生成する複合体の形成に十分な時間および条件下で接触させ、（b）該抗体を含有する生成した該複合体を検出することを含んでなり、該抗体は、配列番号2またはその断片のヒト変異体 $\alpha$ 7サブユニットに特異的に結合する。

#### 治療用途

ヒト $\alpha$ 7のバリリン274からトレオニンへの自発的突然変異および関連突然変異は、該タンパク質を発現する細胞の死を引き起こす又は早める可能性がある。少なくとも以下の2つのタイプの治療を行なうことが可能であろう：（i）メチルリカコニチンまたは改善された血液脳関門透過性を有する別の化合物などの選択的 $\alpha$ 7アンタゴニストの投与、または（ii）該タンパク質の合成を阻止するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド療法（例えば、AlbertおよびMorris(1994), Antisense knockouts: molecular scalpels for the dissection of signal transduction. Trends in Pharmacological Sciences 15:250-254を参照された

い)、または (iii) 癌細胞などの細胞を殺す

試薬としての治療。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド5'-GGCTACACCTCAT GGGCTCG (配列番号9)を使用することができる。したがって、このオリゴヌクレオチドその他は、野生型を含むいずれかの $\alpha 7$ サブユニットタンパク質の合成を阻止するであろう。しかしながら、該変異体は発現されるが野生型は発現されない場合、または野生型のノックアウトが該変異体の発現の継続ほど有害でない場合においてもなお、そのようなオリゴヌクレオチドは有用であろう。このアンチセンスの有効性は、インビトロで示され、また、該アンチセンスは、 $\alpha 7$ サブユニットの機能を評価するための研究手段として貴重であろう。

アンチセンス技術を用いて、三重らせんの形成またはDNAもしくはRNAにより遺伝子発現を減弱させることが可能であり、それらの方法は共に、DNAまたはRNAに対するポリヌクレオチドの結合に基づく。例えば、10~40塩基対長のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計するために、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の5'コード部分を使用することができる。転写に関与する遺伝子の領域に対して相補的となり、それによりヒト変異体 $\alpha 7$ サブユニットポリペプチドの転写および産生を妨げるように、DNAオリゴヌクレオチドを設

計する。該アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドは、インビボでmRNAにハイブリダイズし、mRNA分子からヒト変異体 $\alpha 7$ サブユニットポリペプチドへの翻訳を阻止する。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、核酸切断に対し該分子を抵抗性にする人工的なヌクレオチド間結合を含有するよう修飾されている場合に、より大きな効力で作用する。そのような人工的なヌクレオチド間結合には、メチルホスファート、ホスホロチオラートおよびホスホロアミダートヌクレオチド間結合が含まれるが、これらに限定されるものではない。

#### 研究および薬物の発見のための用途

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、 $\alpha 7$ 野生型およびV274Tの機能ならびに細胞傷害性のメカニズム全般を決定する場合にも貴重であろう。例えば、細胞傷害性、細胞保護または他の細胞過程に対する $\alpha 7$ V274Tの寄与を評価する1つの方

法は、その合成の特異的阻止が過程を阻止するか否かを判定することであろう。これは、該タンパク質の全作用を阻止することが可能または不可能な受容体アンタゴニストの使用とはアプローチ的に異なる。また、薬物の発見においては、このアプローチは、薬物の効果が $\alpha$ 7V274T変異体により媒介されるか否かを評価する

場合に有用であろう。他の変異体または野生型サブユニット自体の寄与を評価するためには、同様のアプローチを用いることが可能であろう。対照実験では、対応する $\alpha$ 7センスおよびミスセンスオリゴヌクレオチド [それぞれ、5' - CGAGCCCATGAGGTGTAGCC (配列番号10) および5' - CCAGGCATTCCGAGCTTGCC (配列番号11)] を使用する。該ミスセンスオリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチド内のGC含量の比率を維持しGeneBank内の公知配列とはマッチしなかったランダム化配列である。

したがって、 $\alpha$ 7nAChRの新規サブユニットをコードするポリヌクレオチドおよびそのアンチセンス変異体を、本明細書に詳しく説明されている種々の方法で 사용할ことが可能である。以上、本発明の好ましい実施形態をある程度詳しく説明してきたが、添付の請求の範囲で定義される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、明らかな変形を施すことが可能であると理解される。

# 配列表

## (2) 配列番号1の情報:

### (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 1591 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Genomic DNA

(xi) 配列: 配列番号1:

|   |      |
|---|------|
| CTCGAGCCC ATG AGG TGT AGC CCC GGA GGA GTG TGG CTG GCA CTG GCA   | 48   |
| GCA TCT CTC CTG CAC GTG TCC CTG CAA GGC GAG TTC CAG AGG AAG CTT | 96   |
| TAC AAG GAG CTG GTC AAG AAC TAC AAT CCC TTG GAG AGG CCC GTG GCC | 144  |
| AAT GAC TCG CAA CCA CTC ACC GTC TAC TTC TCC CTG AGC CTC CTG CAG | 192  |
| ATC ATG GAC GTG GAT GAG AAG AAC CAA GTT TTA ACC ACC AAC ATT TGG | 240  |
| CTG CAA ATG TCT TGG ACA GAT CAC TAT TTA CAG TGG AAT GTG TCA GAA | 288  |
| TAT CCA GGG GTG AAG ACT GTT CGT TTC CCA GAT GGC CAG ATT TGG AAA | 336  |
| CCA GAC ATT CTT CTC TAT AAC AGT GCT GAT GAG CGC TTT GAC GCC ACA | 384  |
| TTC CAC ACT AAC GTG TTG GTG AAT TCT TCT GGG CAT TGC CAG TAC CTG | 432  |
| CCT CCA GGC ATA TTC AAG AGT TCC TGC TAC ATC GAT GTA CGC TGG TTT | 480  |
| CCC TTT GAT GTG CAG CAC TGC AAA CTG AAG TTT GGG TCC TGG TCT TAC | 528  |
| GGA GGC TGG TCC TTG GAT CTG CAG ATG CAG GAG GCA GAT ATC AGT GGC | 576  |
| TAT ATC CCC AAT GGA GAA TGG GAC CTA GTG GGA ATC CCC GGC AAG AGG | 624  |
| AGT GAA AGG TTC TAT GAG TGC TGC AAA GAG CCC TAC CCC GAT GTC ACC | 672  |
| TTC ACA GTG ACC ATG CGC CGC AGG ACA CTC TAC TAT GGC CTC AAC CTG | 720  |
| CTG ATC CCC TGT GTG CTC ATC TCC GCC CTC GCC CTG CTG GTG TTC CTG | 768  |
| CTT CCT GCA GAT TCC GGG GAG AAG ATT TCC CTG GGG ATA ACA GTC TTA | 816  |
| CTC TCT CTT ACC ACC TTC ATG CTG CTC GTG GCT GAG ATC ATG CCC GCA | 864  |
| ACA TCC GAT TCG GTA CCA TTG ATA GCC CAG TAC TTC GCC AGC ACC ATG | 912  |
| ATC ATC GTG GGC CTC TCG GTG GTG GTG ACG GTG ATC GTG CTG CAG TAC | 960  |
| CAC CAC CAC GAC CCC GAC GGC GGC AAG ATG CCC AAG TGG ACC AGA GTC | 1008 |
| ATC CTT CTG AAC TGG TGC GCG TGG TTC CTG CGA ATG AAG AGG CCC GGG | 1056 |
| GAG GAC AAG GTG CGC CCG GCC TGC CAG CAC AAG CAG CGG CGC TGC AGC | 1104 |
| CTG GCC AGT GTG GAG ATG AGC GCC GTG GCG CCG CCC GCC AGC AAC     | 1152 |
| GGG AAC CTG CTG TAC ATC GGC TTC CGC GGC CTG GAC GGC GTG CAC TGT | 1200 |
| GTC CCG ACC CCC GAC TCT GGG GTA GTG TGT GGC CGC ATG GCC TGC TCC | 1248 |
| CCC ACG CAC GAT GAG CAC CTC CTG CAC GGC GGG CAA CCC CCC GAG GGG | 1296 |
| GAC CCG GAC TTG GCC AAG ATC CTG GAG GAG GTC CGC TAC ATT GCC AAC | 1344 |
| CGC TTC CGC TGC CAG GAC GAA AGC GAG GCG GTC TGC AGC GAG TGG AAG | 1392 |
| TTC GCC GCC TGT GTG GTG GAC CGC CTG TGC CTC ATG GCC TTC TCG GTC | 1440 |
| TTC ACC ATC ATC TGC ACC ATC GGC ATC CTG ATG TCG GCT CCC AAC TTC | 1488 |
| GTG GAG GCC GTG TCC AAA GAC TTT GCG TAACCACGCC TGGTTCTGTA       | 1535 |
| CATGTGAAA ACTCACAGAT GGGCAAGCGC TTTGGCTTGG CGAGATTCGG CCGGAA    | 1591 |



(2) 配列番号 2 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 502 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

(xi) 配列 : 配列番号 2 :

|   |     |
|---|-----|
| Met Arg Cys Ser Pro Gly Gly Val Trp Leu Ala Leu Ala Ala Ser Leu | 16  |
| Leu His Val Ser Leu Gln Gly Glu Phe Gln Arg Lys Leu Tyr Lys Glu | 32  |
| Leu Val Lys Asn Tyr Asn Pro Leu Glu Arg Pro Val Ala Asn Asp Ser | 48  |
| Gln Pro Leu Thr Val Tyr Phe Ser Leu Ser Leu Leu Gln Ile Met Asp | 64  |
| Val Asp Glu Lys Asn Gln Val Leu Thr Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met | 80  |
| Ser Trp Thr Asp His Tyr Leu Gln Trp Asn Val Ser Glu Tyr Pro Gly | 96  |
| Val Lys Thr Val Arg Phe Pro Asp Gly Gln Ile Trp Lys Pro Asp Ile | 112 |
| Leu Leu Tyr Asn Ser Ala Asp Glu Arg Phe Asp Ala Thr Phe His Thr | 128 |
| Asn Val Leu Val Asn Ser Ser Gly His Cys Gln Tyr Leu Pro Pro Gly | 144 |
| Ile Phe Lys Ser Ser Cys Tyr Ile Asp Val Arg Trp Phe Pro Phe Asp | 160 |
| Val Gln His Cys Lys Leu Lys Phe Gly Ser Trp Ser Tyr Gly Gly Trp | 176 |
| Ser Leu Asp Leu Gln Met Gln Glu Ala Asp Ile Ser Gly Tyr Ile Pro | 192 |
| Asn Gly Glu Trp Asp Leu Val Gly Ile Pro Gly Lys Arg Ser Glu Arg | 208 |
| Phe Tyr Glu Cys Cys Lys Glu Pro Tyr Pro Asp Val Thr Phe Thr Val | 224 |
| Thr Met Arg Arg Arg Thr Leu Tyr Tyr Gly Leu Asn Leu Leu Ile Pro | 240 |
| Cys Val Leu Ile Ser Ala Leu Ala Leu Leu Val Phe Leu Leu Pro Ala | 256 |
| Asp Ser Gly Glu Lys Ile Ser Leu Gly Ile Thr Val Leu Leu Ser Leu | 272 |
| Thr Thr Phe Met Leu Leu Val Ala Glu Ile Met Pro Ala Thr Ser Asp | 288 |
| Ser Val Pro Leu Ile Ala Gln Tyr Phe Ala Ser Thr Met Ile Ile Val | 304 |
| Gly Leu Ser Val Val Val Thr Val Ile Val Leu Gln Tyr His His His | 320 |
| Asp Pro Asp Gly Gly Lys Met Pro Lys Trp Thr Arg Val Ile Leu Leu | 336 |
| Asn Trp Cys Ala Trp Phe Leu Arg Met Lys Arg Pro Gly Glu Asp Lys | 352 |
| Val Arg Pro Ala Cys Gln His Lys Gln Arg Arg Cys Ser Leu Ala Ser | 368 |
| Val Glu Met Ser Ala Val Ala Pro Pro Pro Ala Ser Asn Gly Asn Leu | 384 |
| Leu Tyr Ile Gly Phe Arg Gly Leu Asp Gly Val His Cys Val Pro Thr | 400 |
| Pro Asp Ser Gly Val Val Cys Gly Arg Met Ala Cys Ser Pro Thr His | 416 |
| Asp Glu His Leu Leu His Gly Gly Gln Pro Pro Glu Gly Asp Pro Asp | 432 |
| Leu Ala Lys Ile Leu Glu Glu Val Arg Tyr Ile Ala Asn Arg Phe Arg | 448 |
| Cys Gln Asp Glu Ser Glu Ala Val Cys Ser Glu Trp Lys Phe Ala Ala | 464 |
| Cys Val Val Asp Arg Leu Cys Leu Met Ala Phe Ser Val Phe Thr Ile | 480 |
| Ile Cys Thr Ile Gly Ile Leu Met Ser Ala Pro Asn Phe Val Glu Ala | 496 |
| Val Ser Lys Asp Phe Ala   | 502 |

(2) 配列番号 3 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 25 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

(xi) 配列 : 配列番号 3 :

|   |    |
|---|----|
| Met Arg Cys Ser Pro Gly Gly Val Trp Leu Ala Leu Ala Ala Ser Leu | 16 |
| Leu His Val Ser Leu Gln Gly Glu Phe                             | 25 |

(2) 配列番号 4 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 118 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 4 :

|  |     |
|--|-----|
| GGGGGCAGCA CTCGAGCCCA TGAGGTGTAG CCCCAGGAGGA GTGTGGCTGG CACTGGCAGC | 60  |
| ATCTCTCCTG CACGTGTCCC TGCAAGGCGA GTTCCAGAGG AAGCTTTACA AGGAGGGG    | 118 |

(2) 配列番号 5 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 20 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 5 :

GTTTGGGTCC TGGTCTTACG

20

(2) 配列番号 6 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 23 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 6 :

GCAGCATGAA GGTGGTAAGA GAG

23

(2) 配列番号 7 の情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 23 塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号 7 :

CTCTCTTACC ACCTTCATGC TGC

23

( 2 ) 配列番号 8 の情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 20 塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( xi ) 配列 : 配列番号 8 :

GTACTGCAGC ACGATCACCG

20

( 2 ) 配列番号 9 の情報 :

( i ) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 20 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 9 :

GGCTACACCT CATGGGCTCG

20

(2) 配列番号 10 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 20 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 10 :

CGAGCCCATG AGGTGTAGCC

20

(2) 配列番号 11 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 20 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 11 :

CCAGGCATTC GGAGCTTGCC

20

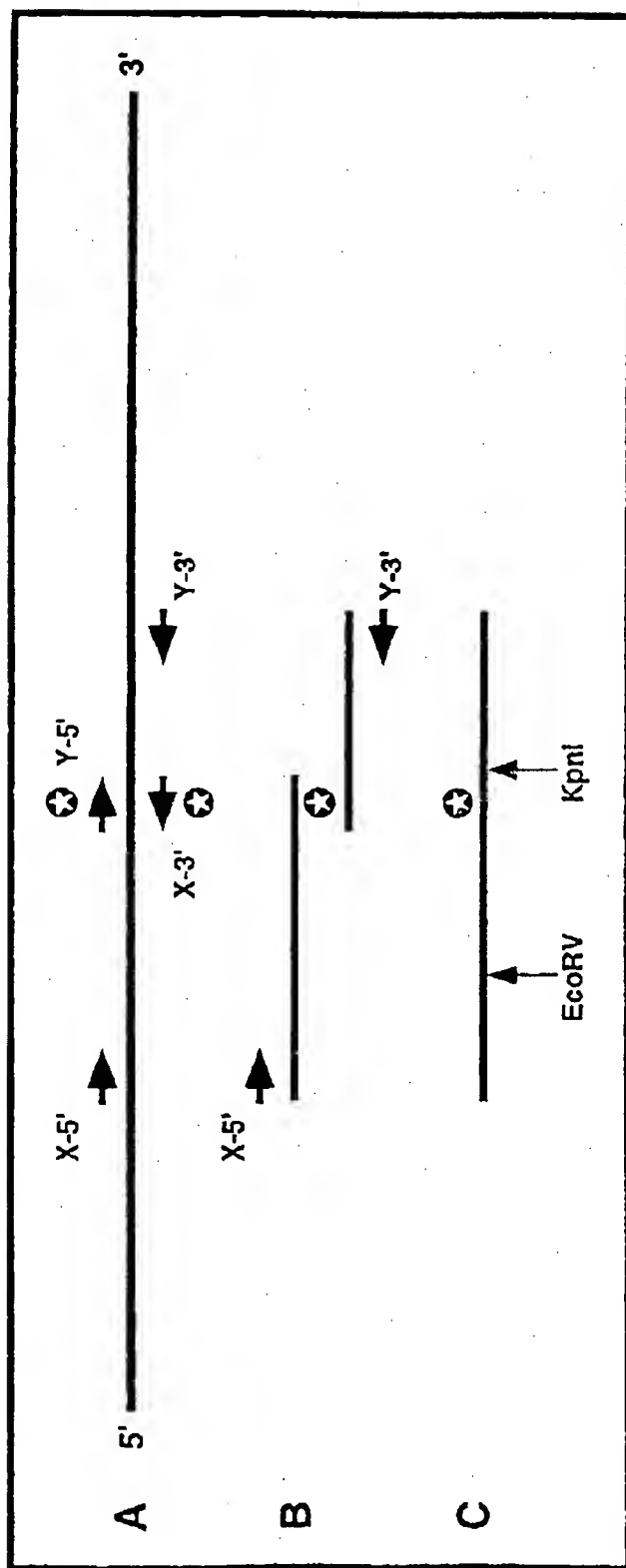


FIGURE 1

TCGAGCCC ATG AGG TGT AGC CCC GGA GGA GTG TGG CTG GCA CTG GCA 39  
M R C S P G G V W L A L A 13

GCA TCT CTC CTG CRC GTG TCC CTG CAA GGC GAG TTC CAG AGG AAG CTT 87  
A S L L H V S L Q G E F Q R K L 29

TAC AAG GAG CTG GTC AAG AAC TAC AAT CCC TTG GAG AGG CCC GTG GCC 135  
Y K E L V K N Y N P L E R P V A 45

AAT GAC TCG CAA CCA CTC ACC GTC TAC TTT TCC CTG AGC CTC CTG CAG 183  
N D S Q P L T V Y F S L L Q 61

ATC ATG GAC GTG GAT GAG AAG AAC CAA GTT TTA ACC ACC AAC ATT TGG 231  
I M D V D E K N Q V L T T N I W 77

CTG CAA ATG TCT TGG ACA GAT CAC TAT TTA CAG TGG AAT GTG TCA GAA 279  
L Q M S W T D H Y L Q W N V S E 93

TAT CCA GGG GTG AAG ACT GTT CGT TTC CCA GAT GGC CAG ATT TGG AAA 327  
Y P G V K T V R P P D G Q I W K 109

CCA GAC ATT CTT CTC TAT AAC AGT GCT GAT GAG CGC TTT GAC GCC ACA 375  
P D I L L Y N S A D E R F D A T 125

TTC CAC ACT AAC GTG TTG GTG AAT TCT TCT GGG CAT TGC CAG TAC CTG 423  
F H T N V L V N S S G H C Q Y L 141

CCT CCA GGC ATA TTC AAG AGT TCC TGC TAC ATC GAT GTA CGC TGG TTT 471  
P P G I F K S S C Y I D V R W F 157

CCC TTT GAT GTG CAG CAC TGC AAA CTG AAG TTT GGG TCC TGG TCT TAC 519  
P F D V Q H C K L K F G S W S Y 173

GGA GGC TGG TCC TTG GAT CTG CAG ATG CAG GAG GCA GAT ATC AGT GGC 567  
G G W S L D L Q M Q E A D I S G 189

FIGURE 2A



|   |      |
|---|------|
| TAT ATC CCC AAT GGA GAA TGG GAC CTA GTG GGA ATC CCC GGC AAG AGG | 615  |
| Y I P N G E W D L V G I P G K R                                 | 205  |
| AGT GAA AGG TTC TAT GAG TGC TCC AAA GAG CCC TAC CCC GAT GTC ACC | 663  |
| S E R F Y E C C K E P Y P D V T                                 | 221  |
| TTC ACA GTG ACC ATG CGC CGC AGG ACA CTC TAC TAT GGC CTC AAC CTG | 711  |
| F T V T M R R R T L Y Y G L N L                                 | 237  |
| CTG ATC CCC TGT GTG CTC ATC TCC GCC CTC GCC CTG GTG TTC CTG     | 759  |
| L I P C V L I S A L A L V F L                                   | 253  |
| CTT CCT GCA GAT TCC GGG GAG AAG ATT TCC CTG GGG ATA ACA GTC TTA | 807  |
| L P A D S G E K I S L G I T V L                                 | 269  |
| CTC TCT CTT ACC ACC TTC ATG CTC CTG GCT GAG ATC ATG CCC GCA     | 855  |
| L S L T T I F M L L V A E I M P A                               | 285  |
| ACA TCC GAT TCG GTA CCA TTG ATA GCC CAG TAC TTC GCC AGC ACC ATG | 903  |
| T S D S V P L I A Q Y F A S T M                                 | 301  |
| ATC ATC GTG GGC CTC TCG GTG GTG GTG ACG GTG ATC GTG CTG CAG TAC | 951  |
| I I V G L S V V V T V I V L Q Y                                 | 317  |
| CAC CAC CAC GAC CCC GAC GGC GGC AAG ATG CCC AAG TGG ACC AGA GTC | 999  |
| H H H D P D G G K M P K W T R V                                 | 333  |
| ATC CTT CTG AAC TGG TGC GCG TGG TTC CTG CGA ATG AAG AGG CCC GGG | 1047 |
| I L L N W C A W F L R M K R P G                                 | 349  |
| GAG GAC AAG GTG CGC CCG GGC TGC CAG CAC AAG CAG CGG CGC TGC AGC | 1095 |
| E D K V R P A C Q H K Q R R C S                                 | 350  |
| CTG GCC AGT GTG GAG ATG AGC GCC GTG GCG CCG CCG CCC GGC AGC AAC | 1143 |
| L A S V E M S A V A P P P A S N                                 | 366  |

FIGURE 2B

GGG AAC CTG CTG TAC ATC GGC TTC CGC GGC CTG GAC GGC GTG CAC TGT 1191  
 G N L L Y I G F R G L D G V H C 382  
 GTC CCG ACC CCC GAC TCT GGG GTA GTG TGT GGC CGC ATG GCC TGC TCC 1239  
 V P T P D S G V V C G R M A C S 398  
 CCC ACG CAC GAT GAG CAC CTC CTG CAC GGC GGC CAA CCC CCC GAG GGG 1287  
 P T H D E H L L L H G G Q P P E G 414  
 GAC CCG GAC TTG GCC AAG ATC CTG GAG GAG GTC CGC TAC ATT GCC AAC 1335  
 D P D L A K I L E E V R Y I A N 430  
 CGC TTC CGC TGC CAG GAC GAA AGC GAG GCG GTC TGC AGC GAG TGG AAG 1383  
 R F R C Q D E S E A V C S E W K 446  
 TTC GCC GCC TGT GTG GAC CGC CTG TGC CTC ATG GCC TTC TCG GTC 1431  
 F A A C V V D R L C L M A F S V 462  
 TTC ACC ATC ATC TGC ACC ATC GGC ATC CTG ATG TCG GCT CCC AAC TTC 1479  
 F T I I C T I G I L M S A P N F 478  
 GTG GAG GCC GTG TCC AAA GAC TTT GCG TAACCACGCTGGTTCTGTACATGTGG  
 V E A V S K D F A  
 AAAACTCACAGATGGGCAAGCGCTTTGGCTTGGCGAGATTCCGGCCGGAA

FIGURE 2C

【図3】

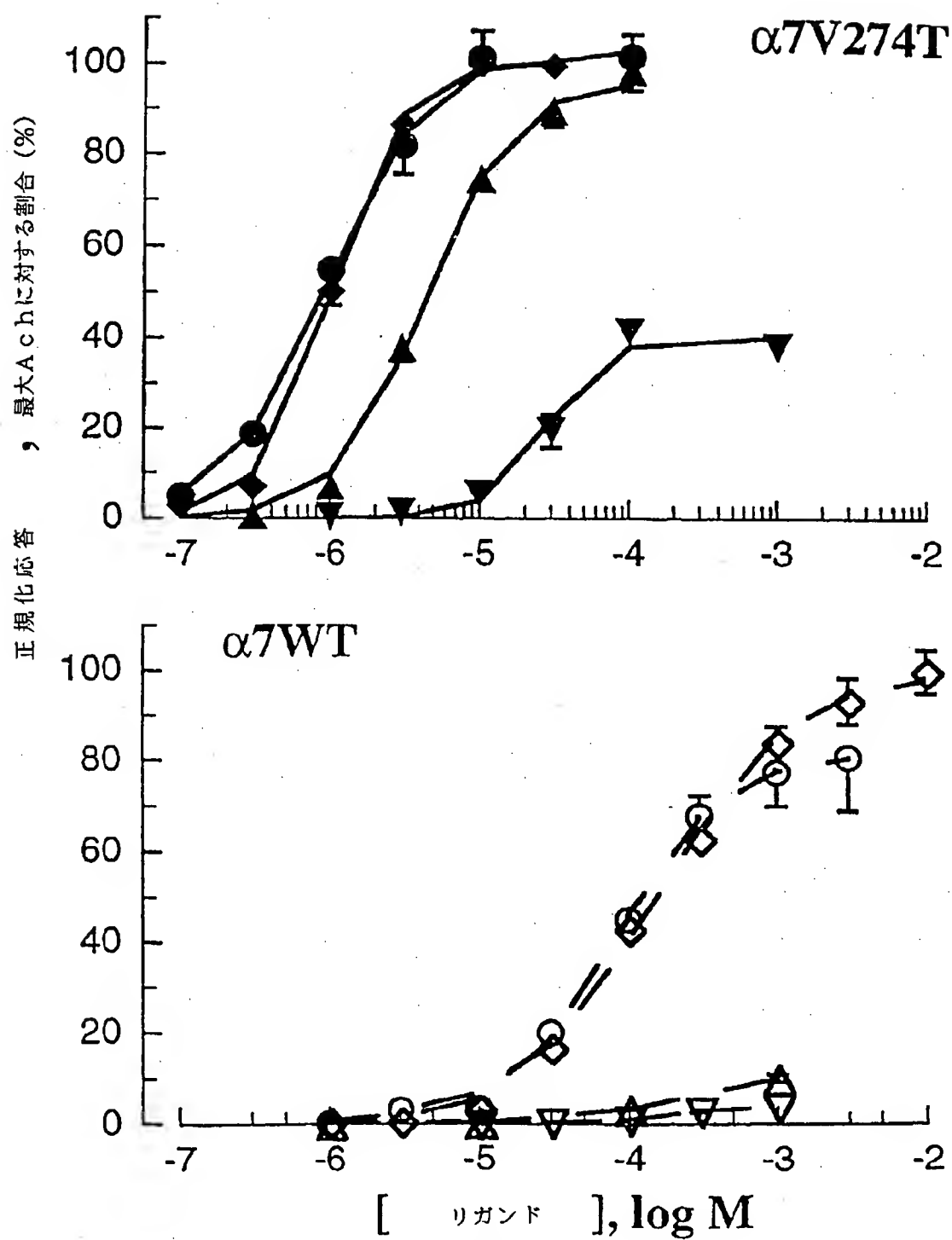


FIGURE 3

【图4】

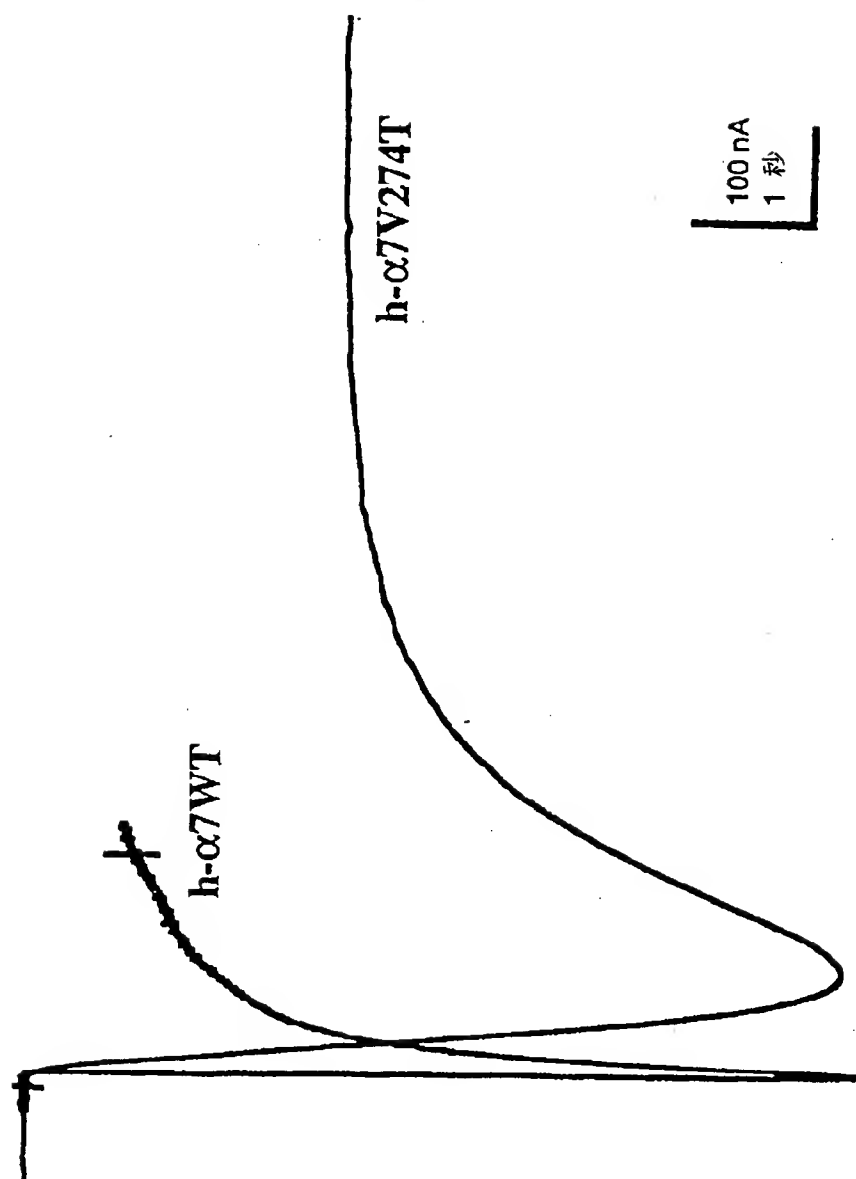


FIGURE 4

【図5】

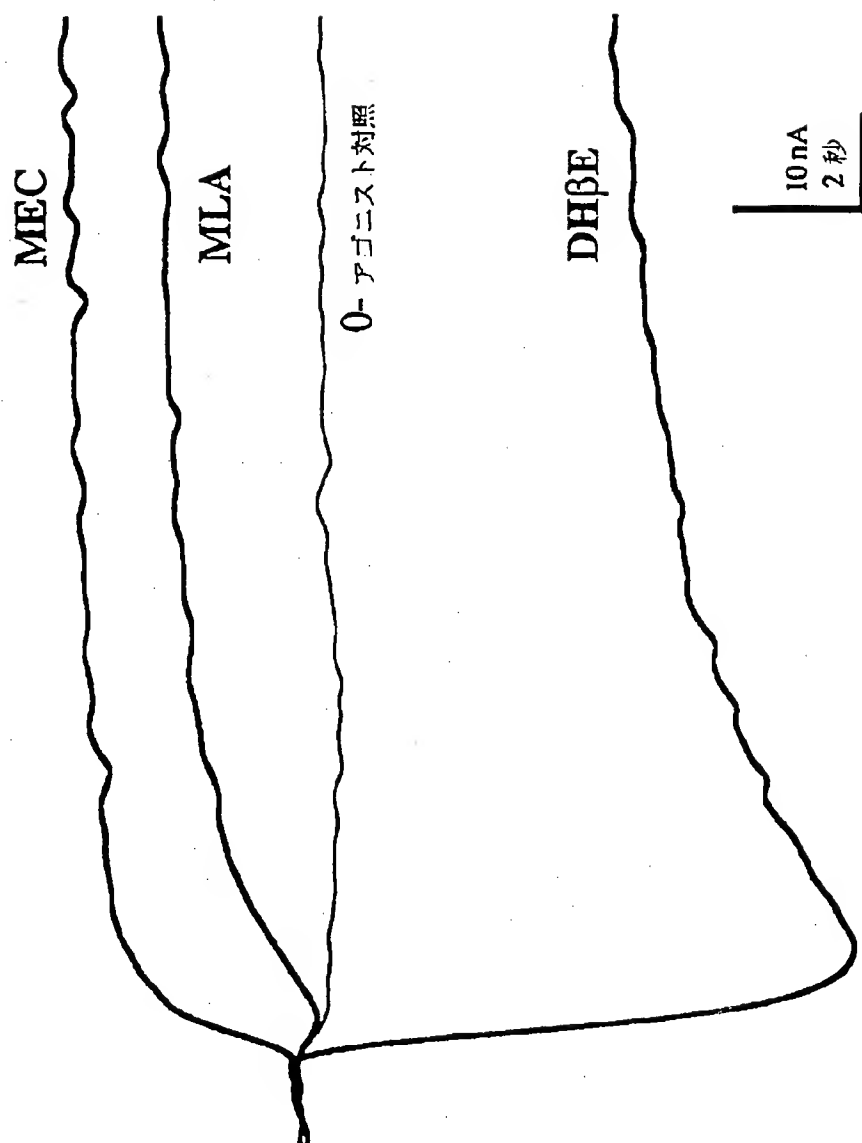
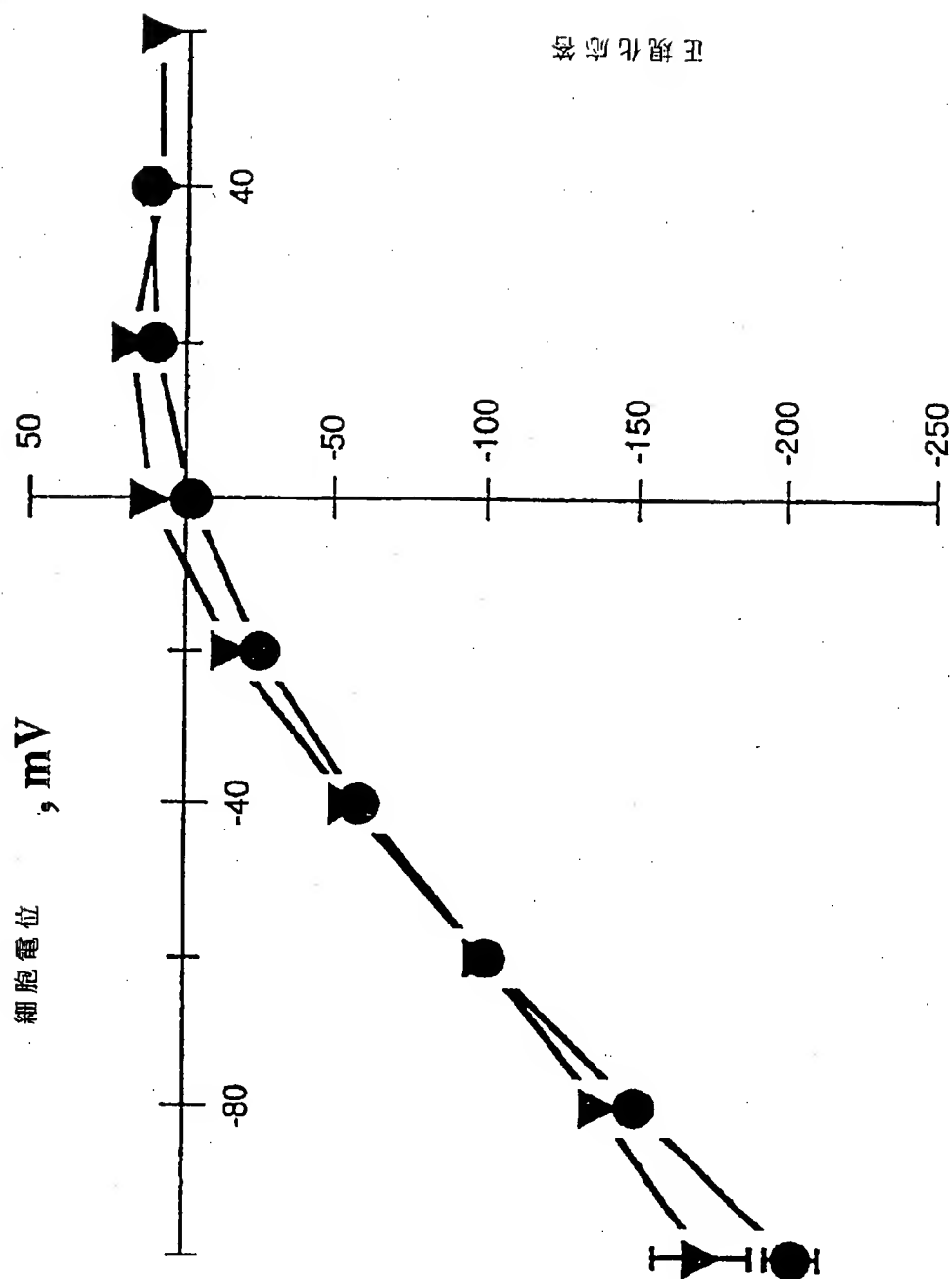


FIGURE 5



【図6】

FIGURE 6

【図7】

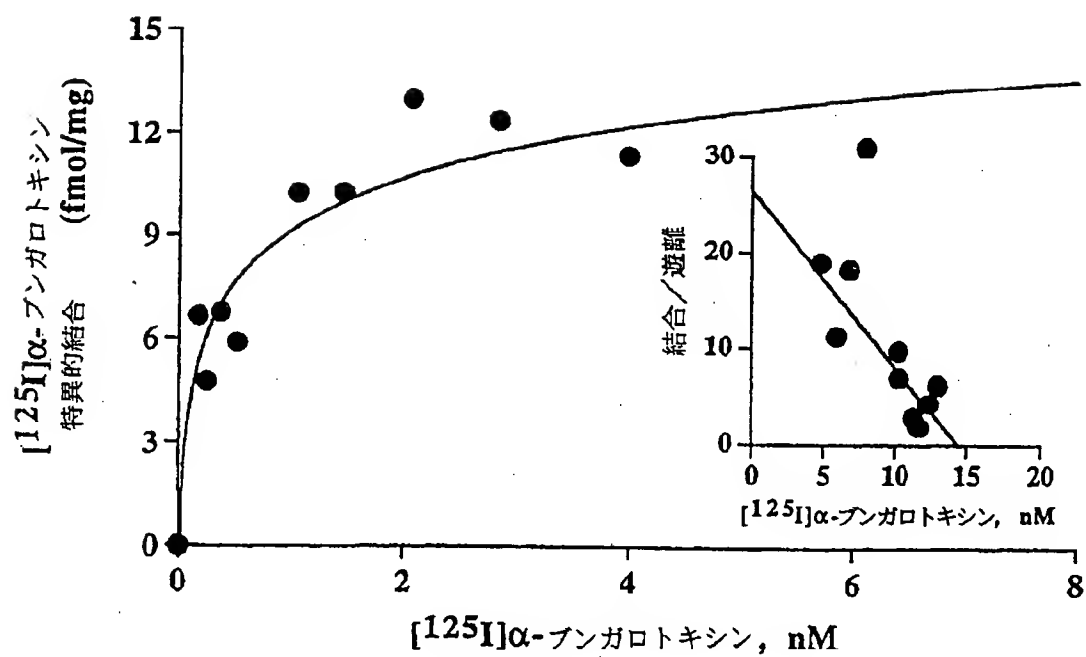


FIGURE 7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 97/23405

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C12N15/11 C12N15/85 C07K14/47 C12P21/08  
601N33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | WO 94 20617 A (THE SALK INSTITUTE<br>BIOTECHNOLOGY/INDUSTRIAL ASSOCIATES, INC.)<br>15 September 1994  | 14-16                 |
| A          | see page 4, line 26 - page 7, line 17<br>see page 14, line 7 - page 15, line 2<br>see page 17, line 4 - page 19, line 2<br>see page 29, line 34 - page 30, line 27<br>see page 32, line 19 - page 33, line 3<br>see Sequence Listing: SEQ ID NO: 7 AND 8<br>see claims 1,6-9,29,43<br>---<br>-/-- | 1-13                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 September 1998

Date of mailing of the international search report

23/09/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5518 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 000 nt,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Donath, C



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 97/23405

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | <p>PENG, X. ET AL.: "Human alpha 7 acetylcholine receptor: Cloning of the alpha 7 subunit from the SH-SY5Y cell line and determination of pharmacological properties of native receptors and functional alpha 7 homomers expressed in <i>Xenopus</i> oocytes"</p> <p>MOLECULAR PHARMACOLOGY, vol. 45, no. 3, March 1994, pages 546-554, XP002076578</p> <p>see 'Materials and Methods'</p> <p>see page 549, right-hand column, paragraph 1 - page 552, left-hand column, paragraph 2; figures 2,3</p> | 14-16                 |
| X          | <p>ELLIOTT, K.J. ET AL.: "Comparative structure of human neuronal alpha 2 - alpha 7 and 82 - 84 nicotinic acetylcholine receptor subunits and functional expression of the alpha 2, alpha 3, alpha 4, alpha 7, 82, and 84 subunits"</p> <p>JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE, vol. 7, 1996, pages 217-228, XP002076579</p>  | 14, 15                |
| A          | <p>see the whole document</p>   | 1-13, 16              |
| Y          | <p>TREININ M. AND CHALFIE M.: "A mutated acetylcholine receptor subunit causes neuronal degeneration in <i>C.elegans</i>"</p> <p>NEURON, vol. 14, no. 4, April 1995, pages 871-877, XP002076580</p> <p>see the whole document</p>   | 1-16                  |
| Y          | <p>GALZI, J.-L. AND CHANGEUX, J.-P.: "Review: Neurotransmitter Receptors VI; Neuronal nicotinic receptors: molecular organization and regulations"</p> <p>NEUROPHARMACOLOGY, vol. 34, no. 6, 1995, pages 563-582, XP002076581</p> <p>cited in the application</p> <p>see page 567, right-hand column, paragraph 3 - page 569, left-hand column, paragraph 2</p> <p>see page 571, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, last paragraph; figures 4,5</p>                                   | 1-16                  |

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 97/23405

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| Y          | <p>BERTRAND, D. ET AL.: "Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal alpha 7 nicotinic receptor"</p> <p>PROC.NATL.ACAD.SCI.USA,<br/>vol. 90, August 1993,<br/>pages 6971-6975, XP002076582<br/>cited in the application<br/>see the whole document</p> | 1-16                  |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 97/23405

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9420617 A                              | 15-09-1994          | AU 694424 B                | 23-07-1998          |
|   |                     | AU 6517394 A               | 26-09-1994          |
|   |                     | CA 2155330 A               | 15-09-1994          |
|   |                     | EP 0688361 A               | 27-12-1995          |
|   |                     | GB 2286397 A,B             | 16-08-1995          |
|   |                     | GB 2308121 A,B             | 18-06-1997          |
|   |                     | JP 8507441 T               | 13-08-1996          |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

| (51) Int. Cl. <sup>7</sup> | 識別記号                  | F I     | テーマコード (参考) |
|----------------------------|-----------------------|---------|-------------|
| C 1 2 N                    | 5/10                  | C 1 2 Q | 1/02        |
| C 1 2 Q                    | 1/02                  |         | 1/68        |
|                            | 1/68                  | G 0 1 N | 33/15       |
| G 0 1 N                    | 33/15                 |         | 33/50       |
|                            | 33/50                 |         | 33/566      |
|                            | 33/566                | C 1 2 N | 5/00        |
|                            |                       |         | A           |
| (72) 発明者                   | マツケナ, デイビッド・ジイ        |         |             |
|                            | アメリカ合衆国、イリノイ・60050、マツ |         |             |
|                            | クヘンリー、コープ・コート・3404    |         |             |
| (72) 発明者                   | モンテツジア, リーサ・エム        |         |             |
|                            | アメリカ合衆国、イリノイ・60046、リン |         |             |
|                            | デンハースト、デイツトマー・239、アパ  |         |             |
|                            | ートメント・2・エイ            |         |             |
| (72) 発明者                   | ロツシユ, ジヤンーマルク         |         |             |
|                            | アメリカ合衆国、イリノイ・60085、ウオ |         |             |
|                            | ークガン、レイクハースト・ドライブ・    |         |             |
|                            | 1020、アパートメント・109      |         |             |
| (72) 発明者                   | サリバン, ジエイムズ・ピイ        |         |             |
|                            | アメリカ合衆国、イリノイ・60015、デイ |         |             |
|                            | アフイーールド、デイメーデール・ドライ   |         |             |
|                            | ブ・705                 |         |             |
| (72) 発明者                   | トウマ, エドワード            |         |             |
|                            | アメリカ合衆国、イリノイ・60064、ノー |         |             |
|                            | ス・シカゴ、ビーコン・ストリート・ナン   |         |             |
|                            | バー204・3313            |         |             |